

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
(Direktor Prof. Dr. Andreas Seekamp),
Sektion Experimentelle Orthopädie und Unfallchirurgie
(Leitung Prof. Dr. rer. nat. Sabine Fuchs)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Effekte pulsierender elektromagnetischer Felder auf zelluläre Prozesse im Rahmen der Knochenregeneration

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Paula Femke Zielhardt
aus Göttingen

Kiel 2018

1. Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Sabine Fuchs

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. Alexa Karina Klettner

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 19.11.2018

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
----------------------------	-----

1	Einleitung	1
1.1	Pulsierende Elektromagnetische Felder	1
1.2	Die Knochenheilung.....	2
1.3	Angiogenese und Osteogenese.....	4
1.4	Mesenchymale Stammzellen.....	5
1.4.1	Osteogene Differenzierung.....	5
1.5	Elektromagnetische Felder in der Anwendung	6
1.6	Fragestellung	8
2	Material und Methoden	10
2.1	Material.....	10
2.1.1	Geräte.....	10
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	11
2.1.3	Reagenzien und Lösungen.....	11
2.1.4	Zellkulturmedien und Zusätze	12
2.1.5	Kits.....	12
2.1.6	Primer	13
2.2	Methoden	13
2.2.1	Zellkultur	13
2.2.2	Behandlung der Zellen	15
2.2.3	Versuchsaufbau.....	16
2.2.4	Prinzip des MTS-Assays	18
2.2.5	Quantitative Realtime-PCR	19
2.2.6	VEGF-ELISA	22
2.2.7	DNA-Quantifizierung.....	23
2.2.8	Mineralisierung	24
2.2.9	Statistische Analysen	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Kultivierung und mikroskopische Beurteilung der MSCs	26
3.2	MTS-Assay zur Evaluierung der Zytotoxizität	26
3.3	Genexpression osteogener Marker	29
3.4	Freisetzung vom angiogenen Wachstumsfaktor VEGF.....	31
3.5	Mineralisierung.....	34

4	Diskussion	37
4.1	Isolierung und Einsatz der mesenchymalen Stammzellen	37
4.2	Beurteilung der Zytotoxizität.....	37
4.3	Möglichkeiten zur Analyse der osteogenen Differenzierung	38
4.4	Beurteilung der Mineralisierung	40
4.5	Analyse zur Freisetzung von VEGF	41
4.6	Versuchsaufbau, Parameter und Anwendung der PEMF-Therapie.....	41
5	Zusammenfassung.....	44
6	Literaturverzeichnis	45
7	Anhang	51
7.1	Danksagung.....	51
7.2	Ethikvotum.....	52
7.3	Veröffentlichungen.....	53

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALP	Alkaline Phosphatase
ALPL	Alkalische Phosphatase
BGLAP	bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	complementary DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Col-I	Kollagen Typ I
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMF	Electromagnetic Field
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m/s}^2$)
min	Minute
ml	Milliliter
MSC	Mesenchymal Stem Cell
MSCs	Mesenchymal Stem Cells
mT	Milli-Tesla
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optical density
ODM	Osteogenes Differenzierungsmedium
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEMF	Pulsed Electromagnetic Field

PEMFT	Pulsed Electromagnetic Field Therapy
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pg	Pikogramm
PMS	Phenazinmethosulfat
RPL13A	Ribosomales Protein L13a
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
sog.	sogenannte
T	Tesla
Tab.	Tabelle
TE-Puffer	Puffer aus TRIS und EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TGF- β	Transforming Growth Factor β
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
λ	Lambda = Wellenlänge
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

1 Einleitung

Die Notwendigkeit einer Verbesserung der Knochenheilung zur Handhabung von Frakturkomplikationen wie Pseudarthrosen und zum frühen Wiederherstellen der Mobilität und Funktion bei Frakturpatienten steigt konstant an (Klontzas et al., 2016). Bei fünf bis zehn Prozent der Frakturen missglückt die normale Knochenheilung, was zu zusätzlichen Operationen, Morbidität und veränderter Lebensqualität des Patienten führt (Wang et al., 2017). Außerdem drohen eine eingeschränkte Leistungsfähigkeit und ein verzögerter oder fehlender Wiedereinstieg in den Beruf.

Seit über 30 Jahren wird die Anwendung elektromagnetischer Felder (EMF) in der Behandlung von Knochenbrüchen untersucht: Studien zum Einsatz bei Wundheilungsstörungen (Kwan et al., 2015), peripherer Nervenregeneration (Hei et al., 2016), traumatischen Hirnverletzungen (Bragin et al., 2015), Rückenschmerzen, Muskeln und Sehnen betreffende Sportverletzungen und weiteren Krankheitsbildern wurden jüngst beschrieben.

Am häufigsten und am erfolgreichsten wird die EMF-Stimulation allerdings als adjuvante Therapieoption zur chirurgischen Behandlung bei knöchernen Funktionsstörungen eingesetzt (Sun et al., 2009; Tsai et al., 2009).

Ein einheitliches Behandlungsschema für die Praxis besteht derzeit noch nicht. Die dieser Therapieform zugrunde liegenden Mechanismen, die Beziehung zwischen extern applizierten elektromagnetischen Feldern und den Reaktionen auf zellulärer Ebene, sind nur wenig verstanden (Wang and Qin, 2012). Die Wirkung verschiedener Parameter wie Frequenz, Intensität und Expositionsdauer auf für die Knochenheilung wichtige zelluläre Prozesse wie osteogene Differenzierung, Proliferation und Mineralisierung wird in vitro untersucht.

1.1 Pulsierende Elektromagnetische Felder

Die „Pulsed Electromagnetic Field Therapy“ (PEMFT) oder pulsierende Magnetfeldtherapie, im Folgenden als PEMF bezeichnet, stellt eine wichtige Modalität im Rahmen der Magnettherapie dar (Markov, 2007). Die meisten Medizingeräte heutzutage nutzen zeitlich veränderte (pulsierende, engl. pulsed) elektromagnetische Felder (Funk et al., 2009). Diese Felder verkörpern eine Klasse von elektromagnetischen Stimuli, die durch eine niedrige

Frequenz von 1 bis 80 Hz und eine Intensität, die von 50 μ T bis 30 mT reicht, charakterisiert sind (Viganò et al., 2016). Die Zulassung von der FDA (Food and Drug Administration, dt. Behörde für Lebens- und Arzneimittel) zur Behandlung von verzögerter Frakturheilung sowie von Pseudarthrosen erfolgte bereits 1979 (Bassett et al., 1982).

Seit vielen Jahren werden PEMF-Geräte in der Klinik mit dem Ziel eingesetzt, den Prozess der Osteoporose zu verlangsamen und die Heilung von Frakturen zu beschleunigen. Verschiedene Theorien zum Wirkmechanismus und unterschiedliche Ergebnisse zur Wirkung auf Lebewesen werden nach wie vor diskutiert (Wang and Qin, 2012). Bodamyali et al. konnten bereits vor zwei Jahrzehnten zeigen, dass klinisch angewandte PEMF in vitro einen reproduzierbaren osteogenen Effekt besitzen (Bodamyali et al., 1998).

Die meisten Autoren teilen die Annahme, dass die Zellmembran das Hauptziel der PEMF-Signale ist (Bonhomme-Faivre et al., 1998; Markov, 2007; Massari et al., 2009). Den Feldern wird ein Einfluss auf das Membranpotential zugesprochen. Die durch die elektromagnetischen Felder erzeugten Ströme im Knochen stellen Stimuli zur Unterstützung der Knochenheilung dar; dazu gehören die Verstärkung Kalzium-vermittelter Signaltransduktion und die gesteigerte Synthese parakriner und autokriner Wachstumsfaktoren durch Osteoblasten (Kooistra et al., 2009). Petecchia et al. gelangten nach ihrer in vitro-Studie an mesenchymalen Stammzellen menschlichen Knochenmarks zu der Erkenntnis, dass die Wirkung der PEMF in erster Linie mit der frühen Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration assoziiert ist (Petecchia et al., 2015). Die Kalzium-Konzentration beeinflusst zelluläre Prozesse wie die Differenzierung, Proliferation und Apoptose (Dupont et al., 2011; Tonelli et al., 2012; Ye, 2010).

Neben dem chirurgischen Vorgehen bietet die PEMF-Therapie eine nicht-invasive und kostengünstige Option zur Beeinflussung der Knochenheilung.

1.2 Die Knochenheilung

Der Knochen besitzt ein beachtliches Vermögen zur Reparatur und Regeneration als Antwort auf eine Verletzung oder chirurgische Behandlung. Die Neugestaltung des Knochens ist ein komplexer Prozess, der die Resorption von Knochengewebe durch Osteoklasten und dessen Aufbau durch Osteoblasten beinhaltet. Das Knochengewebe besteht aus einem Netzwerk von reifen Knochenzellen, den Osteozyten, das in eine Extrazelluläre Matrix (EZM) aus 25 % Wasser, 30 % organischem Material und 45 % anorganischen Mineralien eingebettet ist. Den Hauptbestandteil des organischen Anteils, des Osteoids, macht Kollagen Typ I (95 %) aus; der Rest setzt sich aus Proteoglykan, Osteonectin, Osteopontin und Osteocalcin zusammen.

Die anorganischen Bestandteile, die Kalziumhydroxylapatitkristalle, verleihen dem Knochen seine Druckfestigkeit.

Die einzigartige Fähigkeit zur Heilung ohne die Ausbildung einer fibrösen Narbe beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass etliche, die Knochenheilung leitende, zelluläre und molekulare Prozesse die Ereignisse während der embryonalen Skelettentwicklung rekapitulieren (Stegen et al., 2015). Man unterscheidet generell zwischen primärer und sekundärer Knochenheilung (Abbildung 1). Wenn die anatomische Adaptation der Frakturenden, ein Abstand von weniger als 0,5 mm ist erforderlich, wiederhergestellt und die Ruhigstellung gewährleistet ist, kann eine primäre Knochenheilung durch die direkte Neugestaltung reifen Lamellenknochens ablaufen (Marsell and Einhorn, 2011).

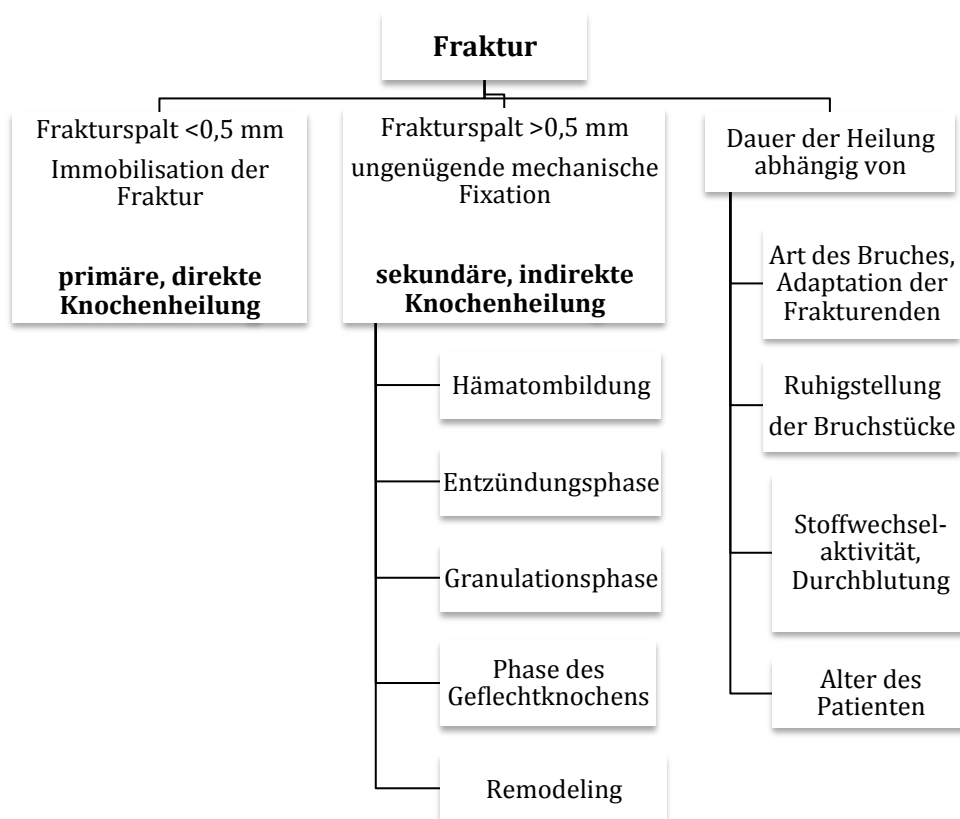


Abbildung 1 Frakturheilung Man unterscheidet zwischen primärer, direkter, und sekundärer, indirekter Knochenheilung. Unter optimalen Bedingungen kann die primäre Knochenheilung durch die direkte Neugestaltung reifen Lamellenknochens ablaufen. Die sekundäre, häufigere Form der Knochenheilung ist ein 5 Phasen-Prozess: Der Knochenschaden und die Unterbrechung der lokalen Blutgefäße führen zunächst zur Hämatombildung und zu einer akuten Entzündungsreaktion (Sivaraj and Adams, 2016). In der nächsten Phase wird das Hämatom durch Granulationsgewebe ersetzt. Im Anschluss findet die Kallushärtung mit Bildung des Geflechtknochens statt. Während des Prozesses des Remodelings, der Umwandlung des Geflechtknochens in reifen lamellären Knochen, werden die aufgrund der Fraktur verloren gegangenen mechanischen Eigenschaften wiederhergestellt (Szczygny, 2015).

Die sekundäre, häufigere Form der Knochenheilung tritt bei größeren Knochendefekten oder weniger guter Adaptation oder Fixation der Frakturrenden auf. Diese indirekte Knochenheilung läuft in fünf Phasen inklusive der Bildung eines Kallus ab.

Zu viel Bewegung und/oder Belastung kann zu Komplikationen im Heilungsprozess führen. Ist dieser nach vier bis sechs Monaten nach dem Trauma noch nicht abgeschlossen, ist die Rede von einer verzögerten Knochenheilung. Bei ausbleibender knöcherner Konsolidierung nach Ablauf von sechs Monaten spricht man von einer Pseudarthrose, dem sog. Falschgelenk (Marsell and Einhorn, 2011). Dieses Ereignis gilt es zu verhindern bzw. zu behandeln.

In den letzten zwei Dekaden hat sich das Verständnis über die Frakturheilung und die daran beteiligten Faktoren und Prozesse rasch entwickelt (Marsell and Einhorn, 2011). Eine kritische Komponente der Knochenheilung ist das rechtzeitige Einsproßen von Blutgefäßen im Frakturkallus.

1.3 Angiogenese und Osteogenese

Die Angiogenese, die Ausbildung neuer Blutgefäße aus vorhandenen, wird nach einer Fraktur durch die lokale Produktion von zahlreichen angiogenen Wachstumsfaktoren angeregt (Stegen et al., 2015). Die Thrombozyten, Knochenzellen und Makrophagen im Bereich der Verletzung sezernieren Zytokine und Wachstumsfaktoren; dazu gehören IL-1 bis IL-6, Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Transforming Growth Factor (TGF-) β , fibroblast growth factor (FGF), Angiopoetin 1 und 2 sowie Bone Morphogenetic Protein (BMP). Der wichtigste proangiogene Faktor ist VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), welcher zur Regulierung der Proliferation, der Migration und des Überlebens von Endothelzellen, welche die Blutgefäße auskleiden, erforderlich ist (Beamer et al., 2010). Studien konnten zeigen, dass Hypoxie und die Produktion von VEGF als Hauptsignale die Angiogenese fördern (Maes et al., 2012; Schipani and Maes, 2009). Im Bereich der Fraktur leitet die Hypoxie, welche aus der Unterbrechung der Gefäß- und Nährstoffversorgung resultiert, die Prozesse ein, die zur Knochenreparatur führen (Schipani and Maes, 2009). Die Angiogenese und die Osteogenese sind eng miteinander verknüpft (Dickson et al., 1994). Hypoxia-inducible factors (HIF), Mediatoren des zellulären Sauerstoff-Signalweges, werden hochreguliert und fördern als Transkriptionsfaktoren die VEGF-Expression (Ogilvie et al., 2012; Percival and Richtsmeier, 2013; Rankin and Giaccia, 2008; Street et al., 2002). VEGF kann durch die Interaktion mit Rezeptoren auf Endothelzellen die Angiogenese induzieren und dadurch indirekt die zur Osteogenese benötigte Bereitstellung von Sauerstoff und

Nährstoffen verbessern. Einen großen Stellenwert für die Osteogenese besitzen Mesenchymale Stammzellen.

1.4 Mesenchymale Stammzellen

Das mesenchymale Stroma beherbergt eine wichtige nicht-blutbildende Zellpopulation, welche die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung besitzt (Dominici et al., 2006; Hass et al., 2011; Keating, 2012; Watt et al., 2013). Diese MSCs (Mesenchymale Stammzellen) können aus adultem (Fettgewebe, peripheres Blut, Knochenmark) und neonatalem Gewebe (bestimmte Teile der Plazenta und Nabelschnur) isoliert werden. Die Isolierung aus dem Knochenmark stellt nach wie vor eine der am häufigsten eingesetzten Methoden zur Gewinnung dar (Hass et al., 2011). Seit Jahrzehnten ist die MSC-basierte Therapie aufgrund oben genannter Eigenschaften das Objekt ausgiebiger Forschung, allerdings hindern die Heterogenität der primären Zellpopulation sowie die unterschiedlichen Protokolle zur Isolierung und Kultivierung den Fortschritt in der klinischen Anwendung (Bieback et al., 2012). Innerhalb jeder MSC-Population existiert eine Variabilität bezüglich des Phänotyps (Bianco et al., 2013). Aus diesem Grund wird eine Kombination aus positiven und negativen Markern vorgeschlagen, um eine Zellkultur als MSCs zu klassifizieren. Die Expression der Oberflächenmarker CD105, CD73, CD29 und CD90 sowie die fehlende Expression von CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79α oder CD19 und HLA-DR-Oberflächenmolekülen zählt zu den formulierten Mindestkriterien (Abdallah and Kassem, 2008; Dominici et al., 2006; Granéli et al., 2014). Außerdem wird zur Definition die Fähigkeit zur Plastik-Adhärenz unter normalen Kulturbedingungen und das in vitro-Differenzierungspotential in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten herangezogen.

1.4.1 Osteogene Differenzierung

Die Differenzierung von MSCs erfolgt über Osteoprogenitorzellen und Präosteoblasten zu Osteoblasten, die später in nicht mehr teilungsfähige Osteozyten umgewandelt werden. Es können drei Phasen im Differenzierungsprozess unterschieden werden (Owen et al., 1990):

- Proliferation
- Reifung der Extrazellulären Matrix
- Mineralisierung

Dieser Differenzierungsprozess beinhaltet das Zusammenspiel einer Vielzahl an Schlüsselfaktoren (Granéli et al., 2014). Die Vorgänge werden u.a. auf

Genexpressionsebene, in der verschiedene Gene als Marker für den Differenzierungsstatus dienen, reguliert. Die folgenden Marker wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Die Hauptkomponente des organischen Anteils der EZM bildet das von den MSCs synthetisierte Kollagen Typ I. Kollagen-Gene werden bereits in der Phase der Proliferation verstärkt exprimiert. Ein weiterer wichtiger Marker ist die Alkalische Phosphatase (ALP), die ihre maximale Expression in der Phase der Reifung der EZM erreicht. Dieses Enzym ist an der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert und für die Mineralisierung unerlässlich; wahrscheinlich durch die Bereitstellung von hohen lokalen Konzentrationen anorganischen Phosphats und Spaltung des Pyrophosphats, das die Mineralisierung hemmen würde (Lüllmann-Rauch, 2012). Die zwei nicht-kollagenen Knochen-EZM-Proteine, Osteopontin und Osteocalcin, werden allgemein als frühe und späte Marker der osteogenen Differenzierung verwendet (Aubin, 1998). Osteocalcin ist das am reichlichsten vorhandene nicht-kollagene Knochenmatrix-Protein (Tsao et al., 2017). Es erreicht seinen Expressionsgipfel mit beginnender Mineralisierung, wenn die Bildung der ALP wieder rückläufig ist. Die Mineralisierung bezeichnet die schrittweise Einlagerung von anorganischen Substanzen, vor allem Kalziumphosphat, in eine organische Matrix.

Eine Vielfalt verschiedener Wachstumsfaktoren, in besonderem Maße die BMPs (bone morphogenetic proteins), sind potente Induktoren osteogener und angiogener Vorgänge während der Knochenreparatur (Oryan et al., 2014). BMP-2 zum Beispiel ist ein wichtiger Vertreter dieser Glykoproteine, welcher in die chondrogene und osteogene Differenzierung von MSCs sowie enchondrale Ossifikation involviert ist (Zhou et al., 2016).

Eine Option, diesen Differenzierungsprozess zu beeinflussen, besteht möglicherweise in der externen Applikation von pulsierenden elektromagnetischen Feldern (Esposito et al., 2012; Jansen et al., 2010; Luo et al., 2012; Ongaro et al., 2014; Petecchia et al., 2015).

1.5 Elektromagnetische Felder in der Anwendung

Zwei Parameter charakterisieren in erster Linie die Eigenschaften von elektromagnetischen Feldern: Frequenz und magnetische Flussdichte. Eine ebenso wichtige Rolle spielt die Expositionsdauer.

Um den Wirkmechanismus der EMF und dessen potentiellen Nutzen in neuartigen Therapieansätzen zu verstehen und vergleichen zu können, ist es erforderlich, dass die oben genannten Parameter in einem einheitlichen System mit definierten experimentellen Bedingungen festgelegt und untersucht werden (Ross et al., 2015). In der Literatur findet man eine Vielzahl an Studien – sowohl in vitro als auch klinisch - mit unterschiedlich

gewählten Parametern. Ein Überblick über einige in vitro-Studien an hBM-MSCs (human bone marrow MSCs) und die Stimulationswirkung auf die Zellen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 Wirkung der PEMFs mit unterschiedlichen Parametern auf das Verhalten mesenchymaler Stammzellen [nach Maziarz et al., 2016]

PEMF-Parameter	Expositionsdauer Quelle	Stimulationswirkung
Magnetische Flussdichte: 1,1 mT Frequenz: 5, 25, 50, 75, 100 und 150 Hz	30 min/Tag über 21 Tage <i>Luo et al., 2012</i>	Anstieg der ALP-Expression und –Aktivität Anstieg der Expression osteogener Marker (Col I, OC) Stimulierung der osteogenen Differenzierung Verstärkung der Matrix-Mineralisierung
Magnetische Flussdichte: 1,8 – 3 mT Frequenz: 75 Hz	8 h/Tag über 14 Tage <i>Esposito et al., 2012</i>	Beschleunigung der Zellproliferation Anstieg des ALP-Expressionsniveaus Steigerung der osteogenen Differenzierung
Dauer der Bursts: 5 ms Dauer der Impulse: 5 µs Magnetische Flussdichte: 0,1 mT Frequenz: 15 Hz	kontinuierliche Exposition <i>Jansen et al., 2010</i>	Anstieg der Matrix-Mineralisierung keine Wirkung auf ALP-Aktivität Hochregulierung osteogener Markergene (BMP-2, OC, OPG) Stimulierung der osteogenen Differenzierung
Dauer der Bursts: 4,5 ms Anzahl der Impulse: 20 Magnetische Flussdichte: 1,8 mT Frequenz: 15 Hz	8 h/Tag während Kultivierungsphase <i>Sun et al., 2010</i>	Beschleunigung der Zellproliferation Anstieg der ALP-Expression und –Aktivität Zeit-abhängige Steigerung der Expression osteogener Marker (BMP-2, Cbfa1, Col I, OC) Verstärkung der Matrix-Mineralisierung
Anzahl der Impulse: 10 Dauer der Impulse: 1,3 ms Magnetische Flussdichte: 1,5 mT Frequenz: 75 Hz	kontinuierlich über 28 Tage <i>Ongaro et al., 2014</i>	Anstieg der ALP-Aktivität Anstieg der OC-Expression Stimulierung der osteogenen Differenzierung Verstärkung der Matrix-Mineralisierung

ALP Alkalische Phosphatase, *BMP* bone morphogenetic protein, *COL* Collagen, *OC* Osteocalcin, *OPG* Osteoprotegerin, *PEMF* Pulsed Electromagnetic Field, *Runx* runt-related transcription factor

Die Frequenzen bewegen sich zwischen 5 und 150 Hz, häufig wird eine Frequenz von 15 Hz oder 75 Hz (Jansen et al., 2010; Kaivosoja et al., 2015; Schwartz et al., 2009; Sun et al., 2010) gewählt. Die Werte der Magnetischen Flussdichte rangieren zwischen 0,1 und 3 mT. Die Expositionsdauer liegt meist bei 8 Stunden pro Tag. Ongaro et al. untersuchten die Wirkung der PEMFs unter kontinuierlicher Exposition über 21 Tage (Ongaro et al., 2014).

1.6 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, Zellen in vitro unter dem Einfluss pulsierender elektromagnetischer Felder hinsichtlich ihres Verhaltens zu untersuchen, welches für Prozesse der Knochenregeneration in vivo wichtig ist. Dafür wurden mesenchymale Stammzellen aus menschlichem Knochenmark isoliert, kultiviert, mithilfe von osteogenem Differenzierungsmedium zu Osteoblasten differenziert und nach festem Schema den elektromagnetischen Feldern ausgesetzt.

Bezüglich der Parameterauswahl zur Behandlung der MSCs wurde ein neuartiger Ansatz gewählt, der sich wie folgt darstellt: Im Vergleich zu vorhergehenden in vitro-Studien wurde die Behandlungszeit auf 10 Minuten täglich und die Frequenz der Impulse auf 3 Hz reduziert bei sechs Sitzungen innerhalb von 14 Tagen. Die Intensität wurde deutlich höher eingestellt; Gruppe A wurde mit 80 mT und Gruppe B mit 150 mT behandelt, Kontrollgruppe C wurde nicht behandelt.

Mit dem Fokus auf den klinischen Einsatz der PEMF-Therapie zur Unterstützung der Knochenheilung wurden die im Folgenden genannten Methoden zur Analyse der Wirkung der Behandlung auf die Zellkulturen angewandt.

Die metabolische Aktivität der Zellen wurde mittels MTS-Assay beurteilt.

Als Marker der osteogenen Differenzierung auf Genexpressionsebene wurden Kollagen I, Osteocalcin und BMP-2 an Tag 7 und Tag 14 mittels Realtime-PCR analysiert. Es sollte untersucht werden, ob es aufgrund der Exposition im zeitlichen Verlauf und im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zu einer veränderten Genexpression kommt.

Die Stimulierung der Angiogenese stellt eine wichtige Strategie zur Beschleunigung der Frakturheilung dar. Mittels eines VEGF-ELISAS wurden die Auswirkungen der elektromagnetischen Impulse auf die Produktion bzw. Bereitstellung dieses für die Angiogenese und die Osteogenese wichtigen Wachstumsfaktors untersucht. Eine Realtime-PCR mit VEGF A als Marker wurde ebenfalls durchgeführt.

Zur Visualisierung der Mineralisierung wurde eine Alizarin Red S-Färbung an Tag 14 durchgeführt.

Anhand der Durchführung und Auswertung der Ergebnisse zu den Prozessen osteogene Differenzierung, Proliferation, Mineralisierung und Angiogenese soll untersucht werden, wie sich unterschiedliche Intensitäten hochenergetischer pulsierender elektromagnetischer Felder auf das Zellverhalten in vitro auswirken.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Fluoreszenz-Mikroplatten-Leser Apollo LB911	Berthold Technologies, D
Gefrierschrank (-20 °C/-30 °C)	Liebherr, Österreich
Gefrierschrank (-80 °C)	Heraeus, Kendro Laboratory Products
ELISA-Reader Infinite® 200 Pro	Tecan Group, Schweiz
Inkubator 1 Heraeus BBD 6220	Thermo Fisher Scientific, USA
Inkubator 2 HeraCell 240	Thermo Fisher Scientific, USA
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Österreich
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, D
Luer-Knochenzange	Aesculap, Tuttlingen, D
Minizentrifuge	Carl Roth, Österreich
Mikroplattenleser Apollo LB 911	Berthold Technologies, D
Neubauer-Zählkammer Improved, 0,0025 cm ²	Labor Optik, Lancing, UK
Pipettierhilfe Pipetus®, Akku-betrieben	Hirschmann, Eberstadt, D
Rotor-Gene® Q-Cycler	Qiagen, Hilden, D
Schüttler Swip	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, D
Sicherheitswerkbank HERASafe	Thermo Fisher Scientific
Spektralphotometer NanoDrop 2000	Thermo Scientific, USA
Stickstoff-Lagertank Locator 4 Plus	Thermo Scientific, USA
TheraCell® 100	GUTH Meditec GmbH, Salach, D
Thermomixer comfort 1,5 ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
Vakuumpumpe	Integra Biosciences, D
Vortexer Vortex-Genie 2™	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad Typ 1004	GFL, Burgwedel, D
Zentrifuge Biofuge primo R	Heraeus, Hanau, D
Zentifuge Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific, D

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Deckgläschen 18 x 18 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Eppendorf-Röhrchen (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Glaspipette	Sarstedt, Nümbrecht, D
Kryoröhrchen Cryo Pure 1,8 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Mikrotiterplatten (24 Well-Format)	TPP, Schweiz
Mikrotiterplatten (96 Well-Format)	Thermo Scientific Nunc, D
Petrischale	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml), serologische	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen (200 µl, 1000µl)	Biosphere
Reagenz- und Zentrifugenröhre (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Röhre (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellfilter (40 µm, 70 µm)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellkulturflaschen (175 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Zellschaber (16 cm, 25 cm)	Sarstedt, Nümbrecht, D

2.1.3 Reagenzien und Lösungen

Reagenzien und Lösungen	Hersteller
Ampuwa® Plastipur Spüllösung	Fresenius, Bad Homburg, D
Aqua dest.	Roth, D
Collagen Type I Rat Tail	Biolab
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
EDTA	Roth, D
Nuclease-freies Wasser	Ambion®, ThermoFisher, USA
Paraformaldehyd (4%)	USB, Cleveland, USA
PBS	ThermoFisher, USA
PicoGreen®-Reagens	ThermoFisher, USA
RNA Lysis Buffer T, peqGold RNA Kit	VWR (ehemals peqlab), Erlangen, D
RNase freies Wasser	VWR (ehemals peqlab), Erlangen, D

Schwefelsäure	Roth, D
Streptavidin HRP	R&D Systems, Bio-Techne
Substrate Reagenz	R&D Systems, Bio-Techne
SYBR Green Master Mix	applied biosystems
Trypan-Blau	Roth, D
Trypsin-EDTA	Gibco, Carlsbad, D
Tween 20	Roth, D

2.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze

Zellkulturmedium	Hersteller
DMEM/ Ham's F-12 (1:1)	Biochrom, Berlin, D
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Biochrom, Berlin, D

Medienzusatz	Hersteller
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinbach, D
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Steinbach, D
Dexamethason	Sigma-Aldrich, Steinbach, D
FBS	PAA Laboratories, Österreich
Penicillin/ Streptomycin	PAA Laboratories, Österreich

2.1.5 Kits

Kit	Hersteller
CellTiter 96® AQueous One Solution Assay	Promega, Mannheim, D
High-Capacity RNA-to-cDNA™-Kits	ThermoFisher, USA
Human VEGF DuoSet ELISA	R&D Systems, Bio-Techne, D
Osteogenesis Assay Kit	Chemicon/Millipore
peqGOLD Total RNA Kit	VWR (ehemals peqlab), Erlangen, D
QuantiTect® Primer Assay	Qiagen, Hilden, D
Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit	ThermoFisher, USA
SYBR Green® PCR Master Mix	Qiagen, Hilden, D

2.1.6 Primer

Primer	Primer Assay Name (Qiagen)	Bestellnummer
ALPL	Hs_ALPL_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00012957
BMP-2	Hs_BMP2_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00012544
BGLAP	Hs_BGLAP_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00232771
Col-I	Hs_COL1A1_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00037793
RPL13A	Hs_RPL13A_1_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT00089915
VEGF A	Hs_VEGFA_2_SG QuantiTect Primer Assay (200)	QT01036861

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für die Versuche wurden mesenchymale Stammzellen aus humanem Knochengewebe von fünf Spendern gewonnen und kultiviert (Vorgehen nach Kolle et al., 2011). Das Material dafür lieferten gespendete Hüftköpfe, welche im Rahmen des Einbaus von Hüftgelenkendoprothesen anfielen. Bei der sogenannten Hüft-TEP, kurz für Hüftgelenktotalendoprothese, wird sowohl der Gelenkkopf als auch die Gelenkpfanne ersetzt. Der Hüftkopf stellt somit Überschussmaterial nach solch einer Operation dar. Die Entnahme des notwendigen Knochenmaterials erfolgte durch ärztliches Personal der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, UKSH, Campus Kiel, nach ausführlicher Aufklärung und schriftlichem Einverständnis der Patienten bei vorliegender Genehmigung der Ethikkommission (siehe Anhang).

Alle zur Gewinnung und Kultivierung der Zellen erforderlichen Arbeitsschritte wurden an einer Sterilbank mit kontinuierlichem laminarem Luftstrom (Sicherheitswerkbank Klasse II) durchgeführt.

2.2.1.1 Isolierung von humanen mesenchymalen Stammzellen aus Knochengewebe

Die Hüftköpfe wurden in vier Teile zersägt. Mithilfe einer sterilisierten Luer-Knochenzange wurde die Spongiosa gewonnen und in eine Petrischale mit PBS (Phosphate Buffered Saline) überführt. Die Knochenfragmente wurden in 50ml-Röhrchen mit Dulbecco's modified Eagle's Medium (+ 15 % FBS, 1 % Fungizin, 1 % Penicillin, 1 % Ciprofloxacin) kräftig geschüttelt, um nicht festhaftende Zellen zu lösen. Die Flüssigkeit wurde in ein neues

Röhrchen gegeben und diese Waschung, nun mit PBS, so oft wiederholt, bis die Flüssigkeit klar war. Die Waschüberstände wurden zentrifugiert (400 g/ 5 Minuten), der Überstand verworfen und das Zellpellet jeweils in 5 ml Buffy Coat Buffer (500 ml PBS + 2,5 ml FBS + 2 ml EDTA) resuspendiert. Im Anschluss wurden die knochenmarkassoziierten Zellen durch Filtration durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 40 µm von Knochenstückchen, Fettgewebe und anderen gröberen Bestandteilen getrennt. Die Zellzahl wurde gemäß Standardprotokoll nach Trypanblau-Färbung mit einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Im Anschluss wurde die Zelllösung erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen, um das Zellpellet in der entsprechenden Menge an DMEM/Ham's F.12-Medium, versetzt mit 20% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin, zu resuspendieren. Die Zellen wurden in einer Dichte von $2 \times 10^6/\text{cm}^2$ (350 Millionen Zellen pro Kulturflasche) in T175-Zellkulturflaschen (175 cm^2) ausgesät, welche zuvor mit jeweils 10 ml verdünntem Collagen Typ I (PBS : Collagen Rat Tail Typ I (3,45 mg/ml) im Verhältnis 100 : 1) beschichtet wurden.

2.2.1.2 Medien und Zellexpansion

Das Nährmedium DMEM/ Ham's F.12, versetzt mit 20 % FBS und 1 % Penicillin, wurde verwendet. In einem Standardinkubator erfolgte unter konstanten Bedingungen bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % die Expansion und Kultivierung der Stammzellen in kollagenbeschichteten T175-Zellkulturflaschen. Alle zwei bis drei Tage wurde das Kulturmedium gewechselt.

2.2.1.3 Passagieren von Zellen

Die Überführung der Zellen in die nächste Passage erfolgte bei Erreichen einer Konfluenz von 90%. Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit PBS gewaschen, um anschließend die Zellen für 10 Minuten bei 37 ° C mit Trypsin/EDTA zu inkubieren. Trypsin verdaut Zell-Matrix-Verbindungen, der Komplexbildner EDTA unterstützt die Ablösung der adhären Zellen vom Boden der Kulturflasche. Nach Kontrolle unter dem Mikroskop, leichtem Klopfen der Kulturflasche und gegebenenfalls zusätzlichem Zellschaber-Einsatz wurden die Zellen vom Boden gelöst, die Trypsinierung durch Zugabe von 10 % FBS in PBS gestoppt, die Zellen in Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert. Nach Resuspension in frischem Medium wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 in neuen, kollagenbeschichteten Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2.1.4 Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer

Die Zellsuspension wurde mit Trypanblau verdünnt, um tote Zellen von lebendigen unterscheiden zu können. Die Zellzahlbestimmung erfolgte unter dem Mikroskop mit einer Neubauer Zählkammer; vier große Quadratflächen wurden ausgezählt. Das durch vier geteilte Ergebnis, der Mittelwert pro Quadrat, wurde mit dem Verdünnungsfaktor und mit dem Faktor 10^4 , der den Kehrwert des Produkts aus Quadratfläche und Kammerhöhe darstellt, multipliziert. Aus der so erhaltenen Zellzahl pro ml wurde durch Multiplikation mit dem Gesamtvolumen der Zellsuspension die Gesamtzellzahl berechnet.

2.2.1.5 Osteogene Differenzierung

Zur Stimulierung der osteogenen Differenzierung erfolgte die weitere Kultivierung der Zellen mit ODM (Osteogenic Differentiation Medium) für zwei Wochen bis Versuchsbeginn. Dafür wurde DMEM/ Ham's F.12 mit 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin sowie den osteogenen Induktoren Dexamethason (100 nM), β -Glycerophosphat (10 mM) und Ascorbinsäure (50 μ M) versetzt. Die Wirksamkeit dieser Induktoren in den entsprechenden Konzentrationen wurde in vielen Studien bewiesen (Coelho and Fernandes, 2000; Kolbe et al., 2011; Langenbach and Handschel, 2013). β -Glycerophosphat dient als organische Phosphatquelle, die für die Mineralisierung von Bedeutung ist. Das Glukokortikoid Dexamethason unterstützt die ostogene Differenzierung der MSCs über die Hemmung der Proliferation (Wang et al., 2012). Ascorbinsäure fördert als Ko-Faktor die Produktion von Osteocalcin und beeinflusst die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (Coelho and Fernandes, 2000).

Der Wechsel des Mediums erfolgte alle zwei bis drei Tage. Die osteogene Differenzierung wurde über die Expression der osteogenen Marker Col-I (Kollagen-I), ALPL (Alkalische Phosphatase), BGLAP (Osteocalcin) und BMP-2 (bone morphogenetic protein-2) mittels Realtime-PCR (siehe Kapitel 2.2.5) und durch die Quantifizierung mittels Alizarin Red-Färbung (siehe Kapitel 2.2.8) nachgewiesen.

2.2.2 Behandlung der Zellen

2.2.2.1 Das Gerät TheraCell®100

Zur hochenergetischen Impulstherapie (HIT®) wurde das Elektromedizingerät TheraCell®100 der Firma GUTH Meditec (seit 2016 unter dem Namen Cellactor® MT1 von

der Firma Storz Medical) eingesetzt, welches nicht-invasiv mit einer Applikationsfrequenz von 1-3 Hz Impulse einer magnetischen Flussdichte von 40 bis maximal 160 mT und einer Eindringtiefe von circa 18 cm an das Gewebe über eine Behandlungsschleife abgibt. Der Hersteller setzt die Bezeichnung HIT® mit der für diese Wirkweise typischen englischen Bezeichnung PEMF gleich, sodass in dieser Arbeit generell von der PEMF-Therapie gesprochen wird.

Das Gerät unterliegt den EG-Richtlinien 93/42/EWG. TheraCell®100 ist ein zugelassenes Medizinprodukt der Klasse IIa und trägt die Kennzeichnung CE 0483. Es findet bereits im Bereich der Schmerzlinderung, der Regeneration und der medizinischen Rehabilitation in der Praxis klinische Anwendung.

Über eine speziell entwickelte und dreifach getwistete, stromdurchflossene Spule, die auf die zu therapierenden Körperstellen aufgelegt wird, werden kurze, extrem starke Magnetfelder im Mikrosekundenbereich an den Körper abgegeben. Durch die äußerst kurze Dauer der einzelnen Impulse findet keine Temperaturerhöhung im Gewebe statt.

Die Behandlung, die ambulant durchgeführt wird und zu der keine Kleidung abgelegt werden muss, ist für den Patienten schmerzfrei; lediglich die einzelnen Impulse sind zu spüren. Laut Hersteller darf die Therapie nicht bei Patienten mit Herzschrittmachern oder sonstigen empfindlichen Implantaten, bei Epilepsie, nach Organtransplantation und Immunsuppression, bei schweren Herzrhythmusstörungen sowie bei akuten schweren Infektionen angewandt werden. Außerdem müssen Scheckkarten, elektronische Schlüssel und Handys außer Reichweite des Geräts abgelegt werden. Das Gerät ist mit entsprechenden Hinweisen gekennzeichnet. Ebenso wurde der Raum, in dem das TheraCell®100 zu Forschungszwecken aufbewahrt und genutzt wurde, beschildert.

2.2.3 Versuchsaufbau

Jeder der fünf Spender lieferte Zellmaterial für die Durchführung eines Durchganges mit drei unterschiedlich behandelten Gruppen (Tab. 2).

Der jeweilige Durchgang erstreckte sich über einen Beobachtungs- und Behandlungszeitraum von 14 Tagen. An Tag 0 wurden die differenzierten Zellen geerntet und mit einer Dichte von 50.000 Zellen pro Well ($26.800/\text{cm}^2$) in Mikrotiterplatten vom 24 Well-Format ausgesät. Nicht benötigte Zellen wurden in Kryoröhrchen weggefroren. Der Wechsel des Osteogenen Differenzierungsmediums erfolgte alle zwei bis drei Tage, 1 ml pro Well.

Tabelle 2 Charakteristika der PEMF-Exposition der Gruppen A, B und C

Gruppe	nähere Beschreibung	Behandlung	Frequenz	Intensität
Gruppe A	geringe Intensität	10 Minuten	3 Hz	50% \pm 80 mT
Gruppe B	hohe Intensität	10 Minuten	3 Hz	100% \pm 150 mT
Gruppe C	Kontrollgruppe	10 Minuten außerhalb des Inkubators	-	-

Die Behandlung der Zellen mit dem TheraCell®100-Gerät mit den Parametern aus Tabelle 2 erfolgte stets an Tag 2, 4, 7, 9, 11 und abschließend an Tag 14. Dazu wurden die Platten (Gruppe A und B) am jeweiligen Behandlungstag aus dem Inkubator genommen und für die zehnminütige Behandlungsdauer innerhalb der Schlaufe positioniert. Um diese Positionierung einheitlich durchführen zu können, wurde eine Schablone angefertigt, welche dann als Vorlage zur immer gleichen Stellung der Mikrotiterplatte diente (Abb. 2). So wurde verhindert, dass die Ergebnisse durch möglicherweise innerhalb der Behandlungsschleife existierende Intensitätsunterschiede beeinflusst wurden. Aus diesem Grund wurden pro Mikrotiterplatte jeweils nur die sechs zentral liegenden Wells genutzt.

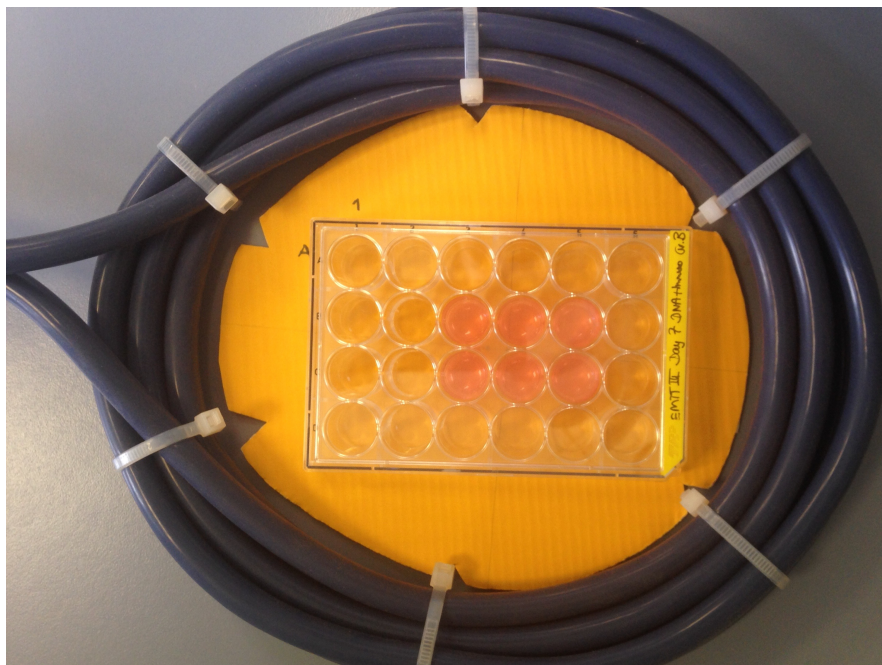


Abbildung 2 Platzierung der Mikrotiterplatte mithilfe der Schablone in der Behandlungsschleife

Die Platten von Gruppe C, der Kontrollgruppe, wurden für 10 Minuten außerhalb des Inkubators deponiert, um einen Einflussfaktor durch die Unterbrechung der Inkubation – Schwanken des CO₂ und der Temperatur - ausschließen zu können.

An Tag 1 sowie an Tag 7 und Tag 14 wurde der MTS-Viabilitäts-Assay durchgeführt sowie an den genannten Tagen Zellen zur späteren DNA-Quantifizierung gewonnen und eingefroren. Die Materialgewinnung und das Einfrieren zur Analyse mittels PCR und ELISA erfolgte an Tag 7 und Tag 14. Die Alizarin Red S®-Färbung zur Quantifizierung der Kalzifizierung erfolgte an Tag 14 (Abb. 3).

Pro Gruppe, pro Analysetag und pro Analyseverfahren wurden drei Replikate gewählt.

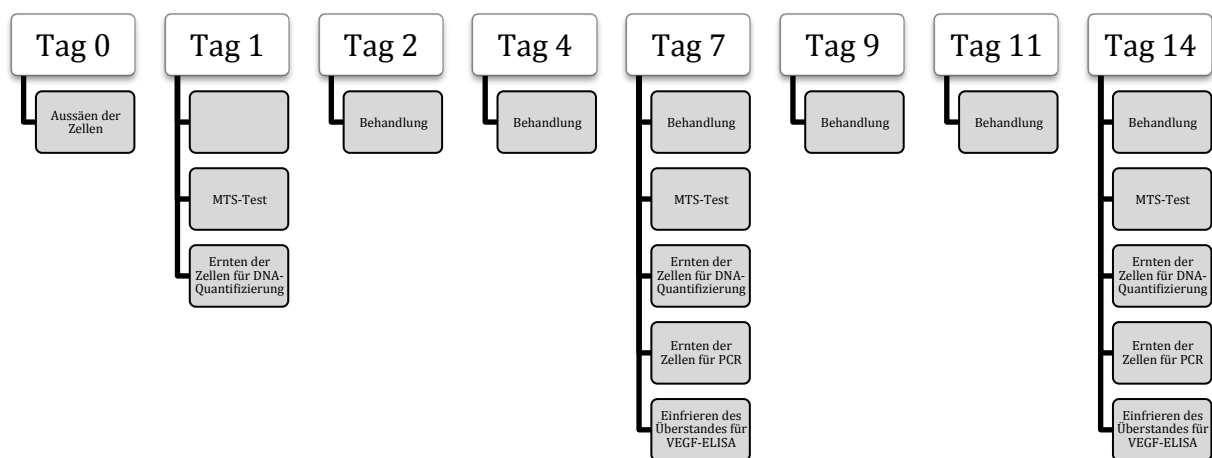


Abbildung 3 Schematischer Versuchsaufbau mit zeitlichem Verlauf

2.2.4 Prinzip des MTS-Assays

Der „CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“ ist eine kolorimetrische Methode zur Ermittlung der metabolischen Aktivität von Zellen. Dieses Reagenz enthält eine Tetrazolium-Verbindung [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium; MTS®] und ein Elektronenkopplungsreagenz (Phenazinmethosulfat; PMS). Das PMS besitzt eine verbesserte chemische Stabilität, wodurch eine Kombination mit MTS zur Herstellung einer stabilen Lösung ermöglicht wird.

Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Reduktion der gelblichen MTS-Tetrazolium-Verbindung (Owen's reagent) in das im Kulturmedium lösliche, blau-violette Formazan.

2.2.4.1 Protokoll

Es wurde eine Lösung aus ODM und MTS im Verhältnis 5 : 1 hergestellt, von welcher 780 µl (650 µl ODM : 130 µl MTS) in jedes zu analysierende Well der 24 Well-Platten gegeben wurde. Nach einer, für diese Konstellation als optimal ermittelten, Inkubationszeit von 90 Minuten bei 37 °C wurden pro Well der 24 Well-Platte sechs Wells der 96 Well-Platte mit je 120 µl befüllt; als Leerwert wurde eine Reihe des Mediums plus MTS ohne Zellen angesetzt. Die Absorption wurde am Spektralphotometer Apollo 1 LB 911 bei $\lambda = 490 \text{ nm}$ gemessen. Die Auswertung erfolgte, indem die OD (Optical Density) des Leerwertes vom Mittelwert der jeweiligen Gruppe abgezogen wurde. Das Ergebnis der Negativkontrolle wurde als 100 % Viabilität definiert und die Ergebnisse der anderen Gruppen in Relation dazu gesetzt.

2.2.5 Quantitative Realtime-PCR

Für die Analyse der Genexpression in den verschiedenen untersuchten Gruppen wurde zunächst die RNA isoliert, in cDNA transkribiert und im Anschluss eine Echtzeit-PCR durchgeführt. Da die Schritte der Umschreibung und der PCR in getrennten Reaktionen durchgeführt wurden, handelte es sich um eine sog. Zwei-Schritt-PCR.

2.2.5.1 RNA-Isolierung mittels peqGOLD Total RNA Kit

An Tag 7 und Tag 14 wurde jedes zur späteren PCR-Analyse bestimmte Well mit PBS gewaschen, pro Well 150 µl Lysepuffer hinzugegeben und nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten bei Raumtemperatur (RT) jeweils das Lysat aus den drei Wells pro Gruppe in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert, um bis zur Analyse bei -80 °C eingefroren zu werden.

Die Proben wurden durch in 2 ml-Sammelröhrchen positionierte DNA-Removing Columns (Säulen) gegeben und zentrifugiert (1 Minute bei 12.000 g). Der Säulendurchfluss, nach Zugabe einer identischen Menge 70prozentigen Ethanol (450 µl) und Vortexen, wurde auf eine PerfectBind-RNA-Column zentrifugiert. Nach erneutem Zentrifugieren (1 Minute bei 10.000 g) wurde das Lysat verworfen, die Columns mit jeweils 500 µl RNA Wasch-Puffer I gewaschen und zentrifugiert (15 Sekunden bei 10.000 g). Pro Probe wurden vorsichtig 75 µl einer Mischung aus DNase I Digestion-Puffer (73,5 µl) und RNase-freiem Wasser (1,5 µl) direkt auf die Membran der Column gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten bei RT wurden die Columns erneut gewaschen (400 µl Wasch-Puffer I), weitere 5 Minuten bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (15 Sekunden bei 10.000 g). Nach zweifachem

Waschen mit 600 µl Wasch-Puffer II pro Column und Röhrchen und jeweils folgendem Zentrifugieren (15 Sekunden bei 10.000 g) erfolgte der Trocknungsschritt in Form eines zweiminütigen Zentrifugierens bei 10.000 g. Danach wurden die Columns in 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen positioniert. 30 µl RNase-freien Wassers wurden vorsichtig direkt auf die Membran jeder Column pipettiert und für 1 Minute bei 5.000 g zentrifugiert.

Anschließend wurde mithilfe des Thermo Scientific NanoDrop™ 2000 Vollspektrum-UV-Vis-Spektralphotometers die RNA-Konzentration dieser gereinigten, eluierten RNA-Lösung bestimmt. Dazu wurden 2 µl-Proben auf die untere Messoberfläche des Geräts, in dem ein optisches Lichtleiterkabel integriert ist, pipettiert. Ein zweites optisches Fasernkabel wird mit der Probe in Verbindung gebracht, sodass die Flüssigkeit den Abstand zwischen den zwei Enden der Fasern durch eine Flüssigkeitssäule überbrückt. Die mittels Software ermittelte Konzentration in ng/µl dient als Grundlage zur Auswahl der geeigneten Probenmenge für die Reverse Transkription.

2.2.5.2 Reverse Transkription

Im nächsten Schritt konnte mithilfe des High-Capacity RNA-to-cDNA™-Kits die Reverse Transkription (RT) der RNA-Proben in cDNA durchgeführt werden. Im modifizierten Protokoll wurden die RNA-Proben zunächst für 10 Minuten bei 70 °C im Thermomixer erhitzt. Die Befüllung der zwischenzeitlich vorbereiteten 0,5 ml-Eppendorf-Röhrchen mit jeweils 20 µl setzt sich wie folgt zusammen: 11 µl Mastermix (bestehend aus 10 µl RT-Puffermix und 1 µl RT-Enzymmix), X µl RNA-Probe (je nach ermittelter RNA-Konzentration; Zielmenge stets 1 µg denaturierte RNA) und (9-X) µl RNase-freies Wasser. Nachdem die Reverse Transkription bei Inkubation für eine Stunde bei 37 °C im Thermomixer ablaufen konnte, inaktivierte im Anschluss das Erhitzen für fünf Minuten auf 95 °C das Enzym. Die Proben wurden zentrifugiert, mit jeweils 80 µl RNase-freiem Wasser auf eine Menge von 100 µl aufgefüllt und die cDNA so bis zur Durchführung der quantitativen Realtime-PCR bei -20 °C gelagert.

2.2.5.3 Quantitative Realtime-PCR

Die quantitative Realtime-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für DNA, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die vorweg synthetisierte cDNA mittels RT dient als Template.

Die Zunahme des Fluoreszenzsignals im Verlauf der Reaktion ist proportional zur Menge des entstehenden PCR-Produkts und kann in Echtzeit verfolgt werden.

Zur Messung der Fluoreszenz der Realtime-PCR wurde in dieser Arbeit der SYBR Green® PCR Master Mix verwendet. Der Mix beinhaltet neben einem Puffer, dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate) und thermostabiler DNA-Polymerase den asymmetrischen Cyanin-Farbstoff SYBR Green®. Dieser interkaliert in doppelsträngiger DNA (dsDNA), sodass über die Messung der Fluoreszenz am Ende jedes Amplifikationszyklus bestimmt werden kann, wie viel DNA amplifiziert wurde.

Als Primer, ein Oligonukleotid, das als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme wie die DNA-Polymerase dient und zur Zielsequenz komplementär ist, wurden Col-I (Kollagen-I), ALPL (Alkalische Phosphatase), BGLAP (Osteocalcin), VEGF A (Vascular Endothelial Growth Factor A) und BMP-2 aus dem QuantiTect™ SYBR® Green Primer Assay eingesetzt.

Zunächst wurden die cDNA-Proben sowie die Primer aufgetaut und anschließend auf Eis gelagert. Von den zentrifugierten Proben wurden 4 µl direkt auf den Boden jedes Röhrchens gegeben. Danach wurde der vorbereitete Reaktionsansatz von 21 µl (12,5 µl SYBR-Green Master Mix plus 2,5 µl des jeweiligen Primers plus 6 µl Nuclease-freies Wasser) in das jeweilige Röhrchen pipettiert. Jeder Ansatz wurde doppelt bestimmt.

Die Durchführung der Realtime-PCR erfolgte in 40 Zyklen im Rotor-Gene® Q-Cycler (Qiagen®) im voreingestellten Thermocycler-Programm (Tab. 3).

Tabelle 3 Programm der Realtime-PCR

Schritt	Zeit	Temperatur
PCR-Aktivierung	5 min	95 °C
Zwei-Schritte-Zyklus		
Denaturierung	5 s	95 °C
kombinierte Primer-Hybridisierung/ Elongation	10 s	60 °C
Zyklusanzahl	35 - 40	

2.2.5.4 Relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres, nicht reguliertes „Housekeeping Gene“, welches unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert wird, bezogen. Als Maß für die Quantifizierung der Startmenge werden die sog. Ct- (engl. für threshold cycle) Werte herangezogen. Der Ct-Wert ist definiert als die Anzahl erforderlicher Zyklen, bei der das Fluoreszenzsignal den Schwellenwert kreuzt, das Hintergrundsignal überschreitet. Ct-Werte sind umgekehrt proportional zu der Menge an Ziel-DNA in der Probe; das heißt, je niedriger der Ct-Wert, desto größer die DNA-Menge und damit die Expression. Die relative Expression des zu untersuchenden Gens in den behandelten experimentellen Proben wird auf ein Kontrollprobenmaterial bezogen. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes erfolgt über die sog. $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, welche erstmals im Jahr 2001 von Livak und Schmittgen beschrieben wurde (Livak and Schmittgen, 2001). Dabei wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des Referenzgens (in dieser Arbeit das Housekeeping Gene RPL13A als endogene Referenz) vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Referenzgen}}$). Nach dieser Normierung wird vom ΔCt -Wert der Probe der ΔCt -Wert einer Kontrolle (in dieser Arbeit Gruppe C) abgezogen, man erhält den jeweiligen $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle ergibt sich aus der Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

2.2.6 VEGF-ELISA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Sandwich-ELISA nach Standardprotokoll (Human VEGF DuoSet® ELISA, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) zur Bestimmung der VEGF-Konzentration im Überstand verwendet. Dafür wird eine Mikrotiterplatte im 96 Well-Format zunächst mit einem primären (Fänger-) Antikörper beschichtet, der nach Inkubation über nach Nacht bei Raumtemperatur die Proben und Standards hinzugefügt werden. An das mit dem immobilisierten Antikörper verknüpfte VEGF-Antigen bindet im nächsten Schritt ein sekundärer (Detektions-) Antikörper, und bildet damit das Sandwich. Dieser Antikörper wird mit einem Enzym, Streptavidin-konjugierte Meerrettichperoxidase (Streptavidin-HRP, von engl. horseradish), gekoppelt. Eine hinzugefügte Substrat-Lösung erzeugt durch Reaktion mit dem Enzym-Antikörper-Zielobjekt-Komplex ein messbares Signal. Die Intensität dieses Signales ist direkt proportional zu der Konzentration von VEGF in der Originalprobe, wird

mithilfe eines Absorptionsphotometers gemessen und bildet zusammen mit der erstellten Standardkurve die Grundlage zur Bestimmung der jeweiligen Konzentration.

2.2.6.1 Assay-Verfahren

Am Vortag wurde die Mikrotiterplatte (96 wells, Medium Binding) mit 100 µl des 1 : 120 verdünnten Capture-Antikörpers (1.00 µg/ml Arbeitskonzentration) pro Well beschichtet und über Nacht bei RT inkubiert. Am Tag der Analyse wurden die Wells dreimal mit je 400 µl Waschpuffer (0,05% Tween® 20 in PBS) gewaschen und danach durch behutsames Klopfen der Platte auf einen Papierstapel vollständig getrocknet. 300 µl Reagent Diluent (1% BSA in PBS) wurden pro Well hinzugefügt und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Dadurch werden unspezifische Bindungen blockiert. Der o.g. Waschvorgang wurde anschließend wiederholt. Die aufgetauten Proben in Form der Überstände der verschiedenen Gruppen und Tage sowie das Medium als Blindprobe wurden in Tripletts pipettiert, jeweils 100 µl pro Well. Eine Verdünnung im Verhältnis von 1:5 (jeweilige Probe : Reagent Diluent) wurde ebenfalls angelegt. Die Standardkurve, ausgehend von einer auf 2 ng/ml verdünnten rekombinanten Human VEGF-Standards, wurde nach dem Schema des Protokolls hergestellt und ebenfalls in Tripletts à 100 µl pro Well pipettiert. Die Platte wurde mit einem Klebestreifen versiegelt für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschk Durchgang wurden 100 µl des auf 100 ng/ml verdünnten Detection-Antikörpers in jedes Well pipettiert, für weitere 2 Stunden bei RT inkubiert und anschließend wiederholt gewaschen. Daraufhin konnten 100 µl der Streptavidin-HRP pro Well hinzugefügt und das Ganze für 20 Minuten bei RT inkubiert werden. Auf einen erneuten Waschvorgang folgte die Hinzugabe von 100 µl der Substrat Lösung (Color Reagent A (H₂O₂) und Color Reagent B (Tetramethylbenzidin) im Verhältnis 1:1), darauf eine Inkubationszeit von 20 Minuten bei RT. 50 µl Schwefelsäure (2N H₂SO₄) pro Well dienten als Stopplösung.

Die Messung der Absorption erfolgte im ELISA-Reader im dualen Modus bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ und 560 nm unter Berücksichtigung eines Blindwertes.

2.2.7 DNA-Quantifizierung

2.2.7.1 Protokoll

Zunächst wurden die Zellen am jeweiligen Tag (Tag 1, 7 und 14) geerntet und eingefroren. Dazu wurden die Wells mit PBS gewaschen, um dann mit 250 µl Trypsin pro Well für 10

Minuten bei 37 °C inkubiert zu werden. Noch unter dem Mikroskop sichtbar anhaftende Zellen wurden gegebenenfalls mit einem Zellschaber gelöst. ODM diente als „Stop Solution“; die gesamte Lösung pro Well wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und im Anschluss zentrifugiert (2000 g/ 5 Minuten). Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml destilliertem Wasser resuspendiert, um bei -80 °C bis zur Analyse eingefroren zu werden.

Zum Zellaufschluss wurden die Proben zunächst dreimal aufgetaut und wieder eingefroren (engl. Freeze-Thaw). Die dadurch erzielte Homogenisierung wurde durch den Einsatz von Ultraschall komplettiert. Dazu wurden die aufgetauten, auf Eis gelagerten Proben mit einem sog. Sonicator behandelt. Die Spitze dieser Ultraschallsonde wurde pro Probe zweimal 15 Sekunden lang, mit einer kurzen Unterbrechung zur Vermeidung einer Überwärmung, in das Eppendorfggefäß eingetaucht.

Die Quantifizierung der DNA wurde mithilfe des Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kits durchgeführt. Das PicoGreen®-Reagens ist ein ultrasensitives fluoreszierendes Nukleinsäure-Färbemittel zur Quantifizierung doppelsträngiger DNA. Der 20X TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5), der zur Verdünnung des PicoGreen®-Reagens, der DNA-Proben und für die Untersuchung ansich benötigt wurde, wurde vor Benutzung 20fach mit sterilem, DNase-freiem Wasser verdünnt. Der im Kit enthaltene DNA-Standard (100 µg/ml) diente der Erstellung der Standardkurve. Die PicoGreen®-Lösung wurde im Verhältnis von 1:200 mit TE-Puffer verdünnt. Nach diesen Vorbereitungen wurde jedes Well der Mikrotiterplatte im 96 Well-Format wie folgt befüllt: 100 µl TE-Puffer plus 72 µl Pico Green-Lösung plus 28 µl DNA-Probe bzw. -Standard. Die Platte wurde für fünf Minuten auf einen Schüttler (150 rpm) gestellt. Mithilfe des Mikroplatten-Fluorometers Infinite M200 (Tecan®) wurde die Fluoreszenz bei einer Anregung von 485 nm und einer Emission von 535 nm gemessen. Anhand der Standardkurve wurde die DNA-Konzentration ermittelt.

2.2.8 Mineralisierung

2.2.8.1 Vorbereitung und Färbung der Zellen

An Tag 14 wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (4% in PBS) fixiert und anschließend dreimal gewaschen, um für die Alizarin Red S®-Färbung vorbereitet zu werden. Alizarin Red ist ein häufig genutztes Färbemittel, um Kalzium-enhaltende Osteozyten in differenzierten Kulturen menschlicher MSCs zu identifizieren, dadurch die Mineralisierung im Knochengewebe zu visualisieren. Kalzium-Ablagerungen sind ein Anzeichen für eine

erfolgreiche osteogene Differenzierung in vitro und können rot-orange mithilfe des Alizarins angefärbt werden.

Dem modifizierten „Alizarin Red Staining Protocol“ aus dem Osteogenesis Assay Kit von Millipore® folgend, wurde das destillierte Wasser der fixierten Zellen entfernt, um dann jedem der drei Wells pro Gruppe 1 mL Alizarin Red-Färbelösung hinzuzufügen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei RT wurden die Wells erneut drei- bis fünfmal für jeweils fünf Minuten vorsichtig mit destilliertem Wasser gewaschen. Durch die Zugabe von 650 µl Cetylpyridiniumchlorid-Lösung (CPC) pro Well und anschließende Inkubation bei RT über Nacht wurde die Färbung gelöst. Jeweils 150 µl der Lösung, als Triplet pro Well der Mikrotiterplatte vom 24 Well-Format, wurden am Folgetag in eine Mikrotiterplatte vom 96 Well-Format überführt. Ebenso wurde eine vorbereitete Standardreihe auf die Platte übertragen. Die Messung des Absorptionsgrades erfolgte im ELISA-Reader Apollo® bei $\lambda = 560$ nm. Anhand der erstellten Standardkurve wurde die von den Zellen aufgenommene Alizarin Red-Menge in µM bestimmt.

2.2.9 Statistische Analysen

Die Datenanalyse sowie die Erstellung der Diagramme erfolgte mit der Software GraphPad Prism (Version 5). Aufgrund der angenommenen nichtnormalen Verteilung der Daten wurden nichtparametrische Tests angewandt; zum Vergleich von einer behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe der Mann-Whitney-U- und der Wilcoxon-Test, zum Vergleich aller drei Stichproben untereinander der Kruskal-Wallis-Test.

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Ergebnisse als Mittelwert + Standardabweichung dargestellt. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Kultivierung und mikroskopische Beurteilung der MSCs

Zur Vorbereitung der durchgeführten Versuche wurden MSCs aus Knochengewebe isoliert. Die Zellen wurden durch ihre Plastikadhärenz von den hämatopoetischen Knochenmarkzellen selektiert. Bereits sieben bis zehn Tage nach der Aussaat zeigte sich die typische spindelförmige Morphologie und die Gruppierung in einzelnen Kolonien, die in den folgenden Tagen zu einem konfluenten Zellrasen heranwuchsen. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:3 gesplittet und expandiert.

3.2 MTS-Assay zur Evaluierung der Zytotoxizität

Mit dem CellTiter 96® AQueous One Solution-Reagenz wurden die Zellen zu den definierten Zeitpunkten (Tag 1, 7 und 14) für 90 Minuten inkubiert und die entstehende Menge an Formazan photometrisch bei 490 nm detektiert. Pro Tag und Kondition wurde aus drei technischen Replikaten der Mittelwert gebildet.

Abbildung 4 zeigt anhand der gemessenen optischen Dichte der fünf Spender am jeweiligen Tag, dass im zeitlichen Verlauf sowohl in den beiden PEMF-exponierten Gruppen als auch in der Kontrollgruppe die Absorption aufgrund der erhöhten metabolischen Aktivität zugenommen hat. Berechnet man die Mittelwerte an den jeweiligen Tagen, fällt Folgendes auf: Innerhalb der mit 80 mT behandelten Gruppe A ist der Absorptionsgrad von Tag 7 bis Tag 14 von $1,142 \pm 0,3508$ auf $1,870 \pm 0,2619$ gestiegen, in der mit 150 mT behandelten Gruppe B von $1,133 \pm 0,3768$ auf $1,874 \pm 0,3499$ und in der unbehandelten Kontrollgruppe von $1,289 \pm 0,3656$ auf $1,946 \pm 0,3725$.

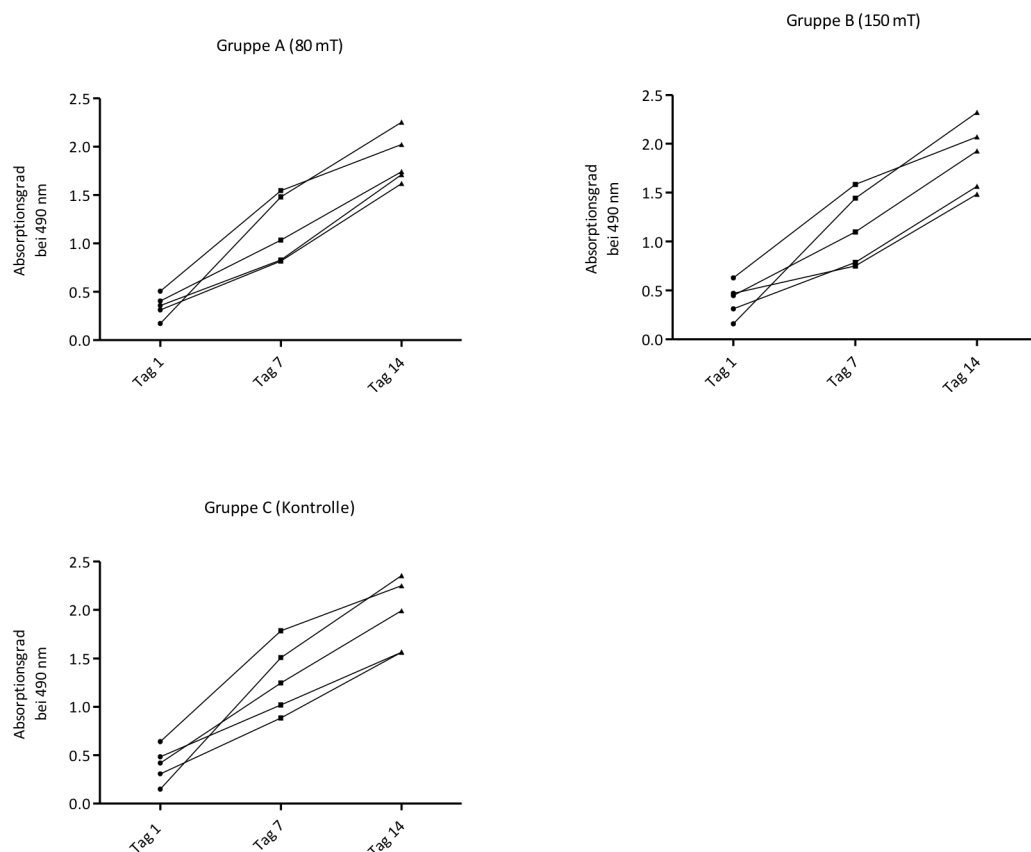


Abbildung 4 Analyse der Zellviabilität nach Behandlung mit pulsierenden elektromagnetischen Feldern unterschiedlicher Intensität (Gruppe A: 80 mT, Gruppe B: 150 mT) und ohne Behandlung (Gruppe C: Kontrollgruppe) im MTS-Assay. Die MSCs wurden nach einheitlichem Schema für 14 Tage behandelt, als Negativkontrolle dienten nicht behandelte Zellen. Nach Zugabe der Reaktionslösung und Inkubation für 90 Minuten bei 37 °C wurde an Tag 1, 7 und 14 die Absorption von Formazan mithilfe eines Photometers bei 490 nm bestimmt. n = 5

Die metabolische Aktivität als prozentualer Anteil wurde mithilfe der gemessenen Optischen Dichte (OD) wie folgt berechnet:

$$((OD_{\text{behandelt}} - OD_{\text{Blindwert}}) / (OD_{\text{Kontrolle}} - OD_{\text{Blindwert}})) \times 100$$

Vergleicht man an den Analysetagen die einzelnen Gruppen untereinander (Abbildung 5), so zeigte sich an Tag 7 in der unbehandelten Kontrollgruppe eine signifikant höhere Zellviabilität als in den behandelten Gruppen (Gruppe C: 100 %, Gruppe A: $88,34 \pm 6,947$ %, $p = 0,02$; Gruppe B: $87,06 \pm 8,121$ %, $p = 0,024$). Bei Betrachtung der einzelnen Spender fällt auf, dass in lediglich zwei Ausnahmen (Tag 14, Spender II, Gruppe A: 109,34 %; Tag 14, Spender VI: 103,57 %) die Kontrollgruppe nicht die Gruppe mit der höchsten Zellviabilität darstellt (Abb. 6).

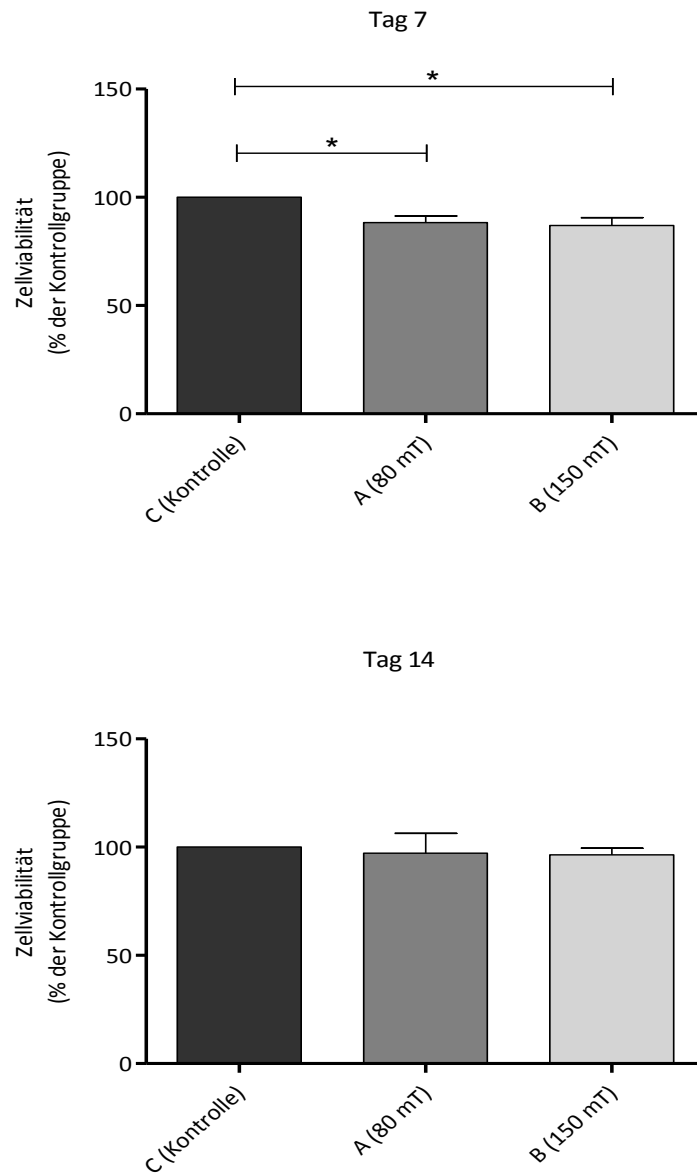


Abbildung 5 Darstellung der Zellviabilität der behandelten Gruppe A (80 mT) und Gruppe B (150 mT) relativ zur Kontrollgruppe (Gruppe C entspricht 100%) an den Analysetagen. Die MSCs wurden nach einheitlichem Schema für 14 Tage behandelt, als Negativkontrolle dienten nicht behandelte Zellen. Nach Zugabe der Reaktionslösung und Inkubation für 90 Minuten bei 37 °C wurde an Tag 1, 7 und 14 die Absorption von Formazan mithilfe eines Photometers bei 490 nm bestimmt. Vergleich der Gruppen aller Spender untereinander (n=5). * signifikant $p < 0,05$

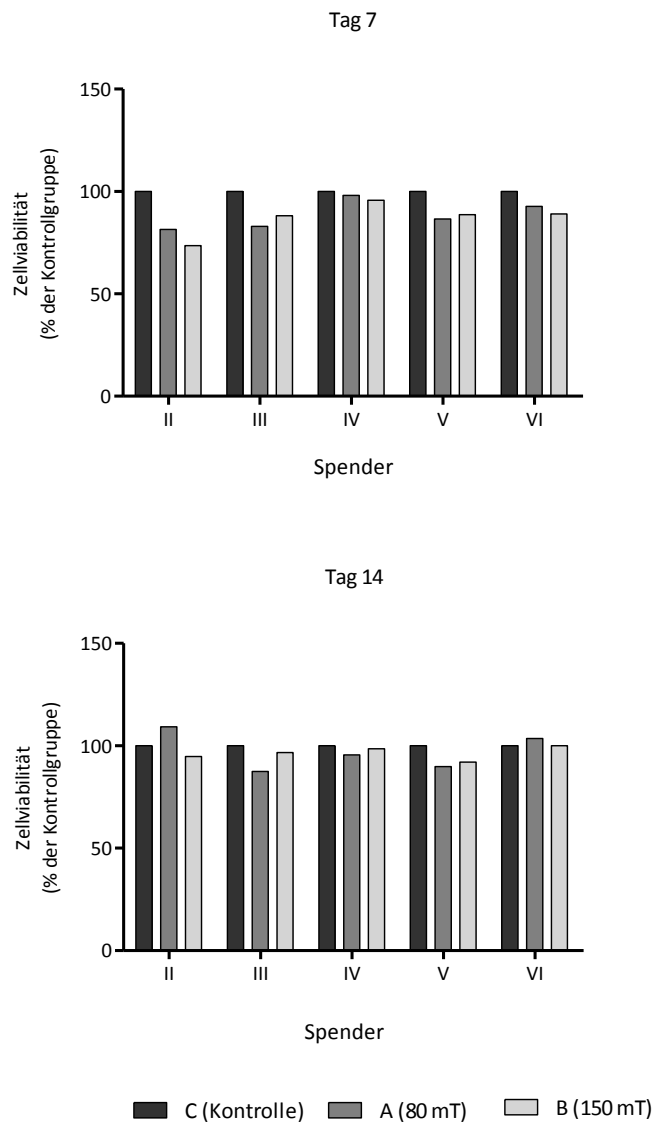


Abbildung 6 Darstellung der Zellviabilität der einzelnen Spender der behandelten Gruppe A (80 mT) und Gruppe B (150 mT) relativ zur Kontrollgruppe (Gruppe C entspricht 100%) an den Analysetagen 7 und 14.

3.3 Genexpression osteogener Marker

An Tag 7 sowie an Tag 14 wurden die Gruppen hinsichtlich der Expression auf mRNA-Ebene der osteoblastären Marker Kollagen I (Col I), Alkalische Phosphatase (ALPL), Osteocalcin (BGLAP) und BMP-2 mittels Realtime-PCR untersucht. Zu diesen Zeitpunkten befanden sich die Zellen bereits drei bzw. vier Wochen im osteogenen Differenzierungsmedium.

Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen, ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Die Grundlage bildet die sog. $\Delta\Delta Ct$ -Methode (siehe Kapitel 2.2.5.4):

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{Gen}_{\text{behandelt}} - \text{RPL13A}_{\text{behandelt}}) - \Delta Ct (\text{Gen}_{\text{Kontrolle}} - \text{RPL13A}_{\text{Kontrolle}})$$

Insgesamt betrachtet zeigten sich sowohl an Tag 7 als auch an Tag 14 keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe (Abb. 7).

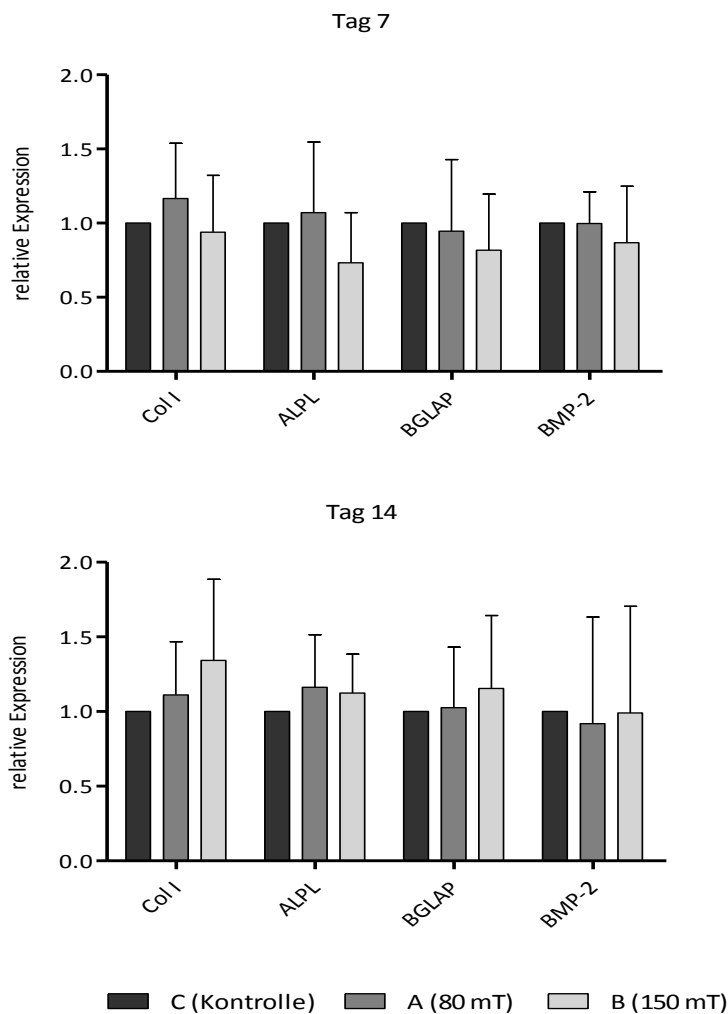


Abbildung 7 Darstellung der relativen Genexpression der osteoblastären Marker Col I, ALPL, BGLAP und BMP-2. An Tag 7 sowie an Tag 14 wurde die Realtime-PCR für die PEMF-exponierten Gruppen A (80 mT) und B (150 mT) und die Kontrollgruppe durchgeführt. Es wurde die $\Delta\Delta Ct$ -Methode angewandt. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle ergibt sich aus der Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Der Expressionsunterschied, jeweils dargestellt als die n-fache Expression der behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (=1), zeigte keine Signifikanz.

Abbildung 8 zeigt die Gegenüberstellung der einzelnen Marker an Tag 7 sowie an Tag 14 zur unbehandelten Kontrollgruppe an Tag 7 als Referenzwert ($2^{-\Delta\Delta Ct} = 1$). Die Unterschiede erreichten keine statistische Signifikanz.

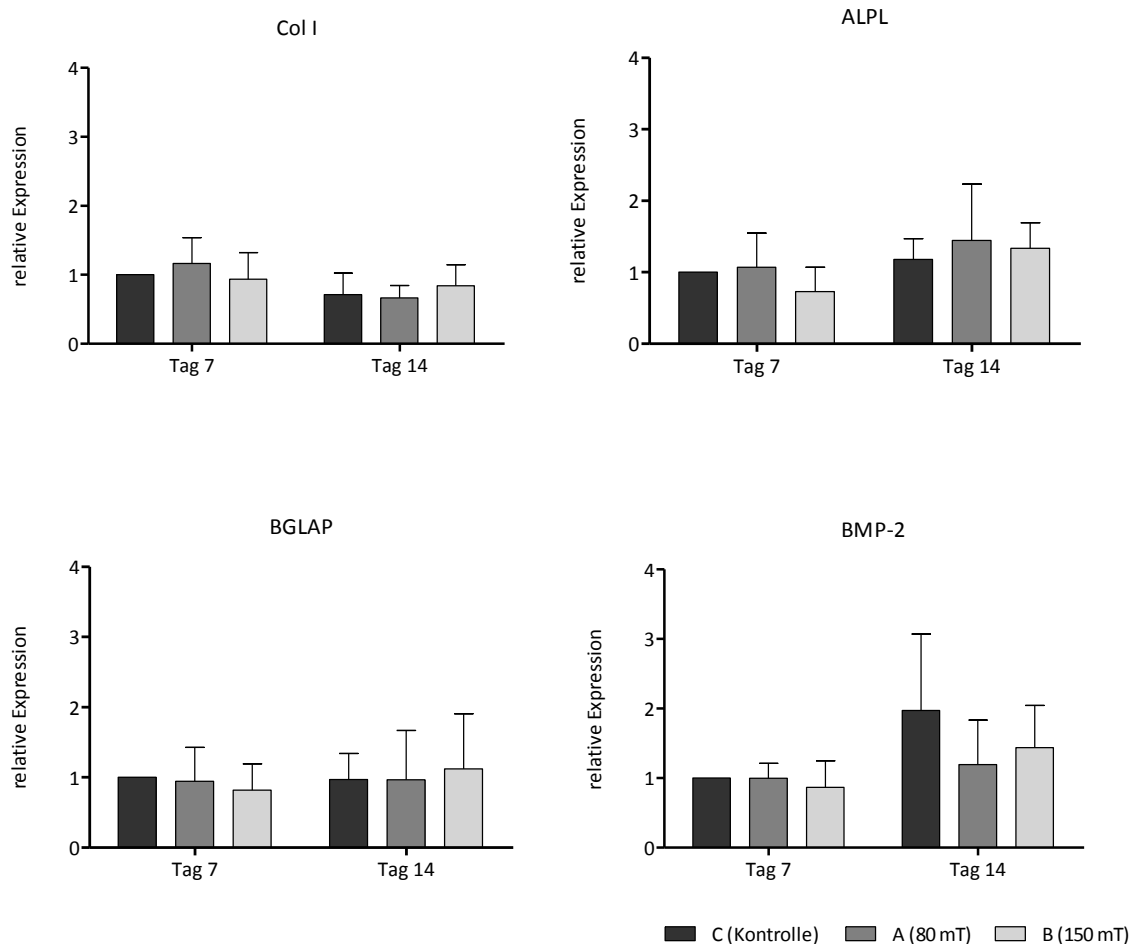


Abbildung 8 Vergleich der relativen Genexpression der osteoblastären Marker Col I, ALPL, BGLAP und BMP-2 an Tag 7 und an Tag 14. An den beiden Tagen wurde die Realtime-PCR für die PEMF-exponierten Gruppen A (80 mT) und B (150 mT) und die Kontrollgruppe durchgeführt. Es wurde zur Auswertung die $\Delta\Delta Ct$ -Methode angewandt. Der Expressionsunterschied, jeweils dargestellt als die n-fache Expression der behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($= 1$) an Tag 7, zeigte keine Signifikanz.

3.4 Freisetzung vom angiogenen Wachstumsfaktor VEGF

Zur Untersuchung des Einflusses der elektromagnetischen Felder auf die VEGF A-Expression, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene, wurde an Tag 7 sowie an Tag 14 eine Realtime-PCR mit dem Marker VEGF A sowie ein VEGF-ELISA der Überstände durchgeführt.

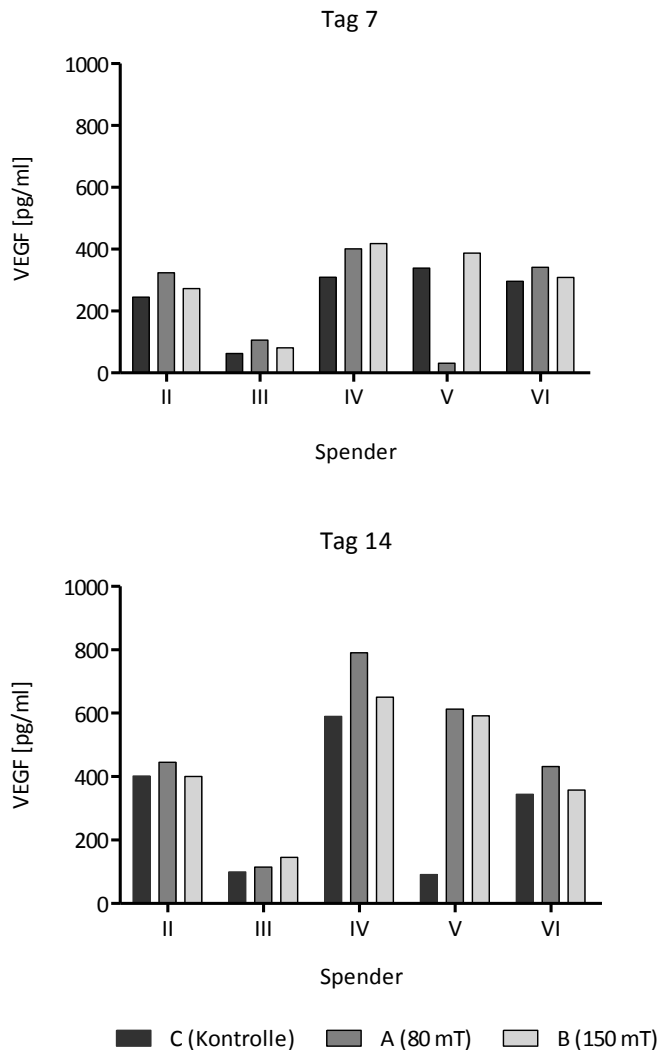


Abbildung 9 VEGF-Konzentration der Überstände der einzelnen Spender II-VI. An Tag 7 und Tag 14 wurden die 1 ml-Überstände der jeweiligen Wells bei -80 °C eingefroren, um später quantitativ mittels ELISA auf die Freisetzung von VEGF durch die differenzierten MSCs untersucht zu werden. Gruppe A wurde mit 80 mT PEMF behandelt, Gruppe B mit 150 mT PEMF, Gruppe C diente als unbehandelte Kontrollgruppe.

Im ELISA zeigte sich, dass die differenzierten MSCs VEGF sezernieren; sowohl in der unbehandelten Kontrollgruppe als auch unter PEMF-Exposition (Abb. 9). Im zeitlichen Verlauf erhöhte sich die VEGF-Konzentration im Überstand. Die Menge war vom Spender abhängig und zeigte zwischen den Spendern eine große Variabilität. Da bei Spender V die Unterschiede zwischen den drei Gruppen und den zwei Messtagen nicht logisch nachvollziehbar sind, wurde dieser in der folgenden Gesamtauswertung nicht berücksichtigt. Um die interindividuellen Unterschiede auszugleichen, wurde bei der Gesamtbetrachtung der Ergebnisse die Menge der Kontrollgruppe jeweils als 100 % und die Menge der behandelten

Gruppen als prozentualer Anteil dargestellt. Insgesamt betrachtet (Abb. 10) war an Tag 7 ($136,09 \pm 22,3$) und Tag 14 ($121,46 \pm 10,4$) die VEGF-Menge im Überstand der mit 80 mT behandelten Zellen (Gruppe A) am höchsten. Der Unterschied zwischen der behandelten Gruppe A und der Kontrollgruppe erreichte an Tag 7 statistische Signifikanz ($p = 0,0417$). Die VEGF-Menge der mit 150 mT behandelten Zellen (Gruppe B) war statistisch nicht signifikant an Tag 7 ($119,7 \pm 14,4$) und an Tag 14 ($115 \pm 21,29$) im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht.

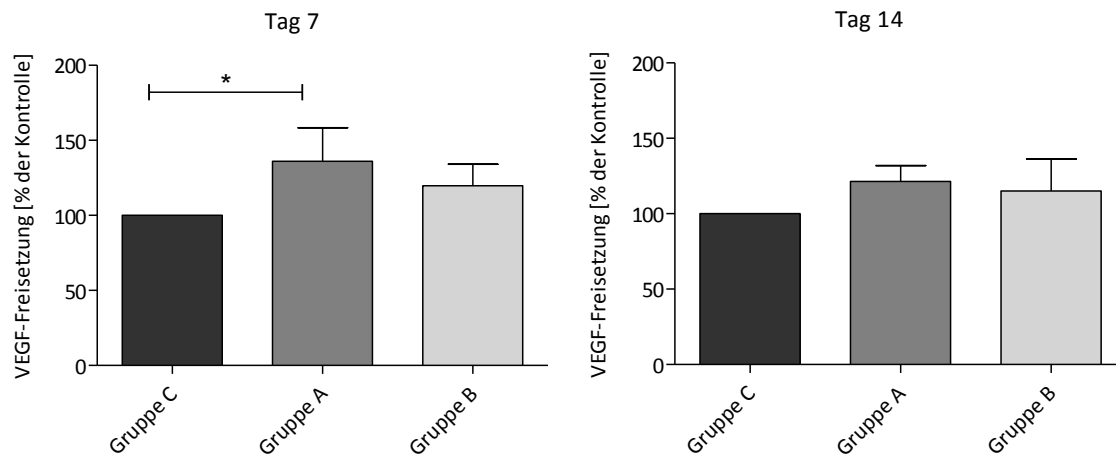


Abbildung 10 VEGF-Konzentration der Überstände der Behandlungsgruppen (Gruppe A = 80 mT, Gruppe B = 150 mT) und der Kontrollgruppe. An Tag 7 und Tag 14 wurden die 1 ml-Überstände der jeweiligen Wells bei -80°C eingefroren, um später quantitativ mittels ELISA auf die Freisetzung von VEGF durch die differenzierten MSCs untersucht zu werden. Die ermittelte Menge der behandelten Gruppen jedes Spenders wurde als prozentualer Anteil der Kontrollgruppe (100 %) berechnet und der Mittelwert pro Gruppe dargestellt. $n = 4$, * signifikant $p < 0,05$

Auf mRNA-Ebene, die Expression des Markers VEGF A wurde an Tag 7 sowie an Tag 14 mittels quantitativer Realtime-PCR untersucht (Abb. 11), zeigte sich keine signifikante Hochregulierung der Expression unter dem Einfluss der pulsierenden elektromagnetischen Felder. Die durchschnittliche Expression der Zellen, die Intensitäten von 80 mT exponiert wurden, war an beiden Analysetagen geringer als in der unbehandelten Gruppe (Gruppe A, Tag 7: $0,874 \pm 0,139$, Tag 14: $0,892 \pm 0,434$).

Die Unterschiede zwischen der mit 150 mT behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe waren vernachlässigbar gering (Gruppe B, Tag 7: $0,899 \pm 0,217$, Tag 14: $1,096 \pm 0,568$).

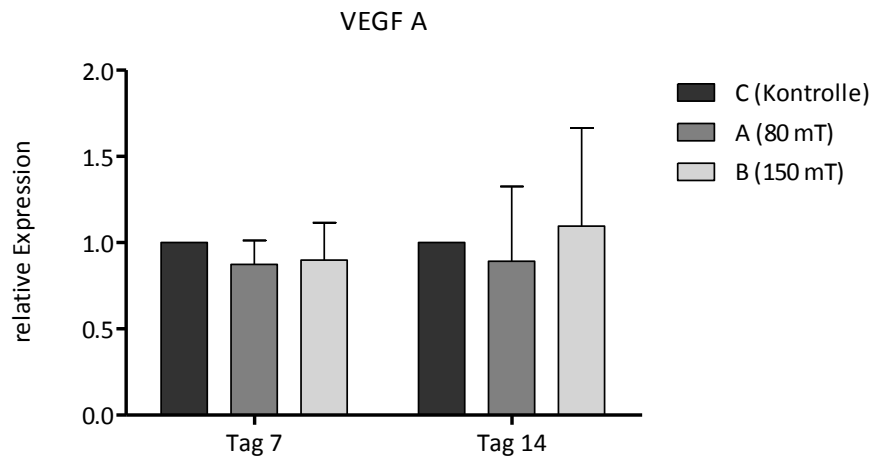


Abbildung 11 Vergleich der relativen Genexpression von VEGF A an Tag 7 und an Tag 14. An den beiden Tagen wurde die Realtime-PCR für die PEMF-exponierten Gruppen A (80 mT) und B (150 mT) und die Kontrollgruppe durchgeführt. Es wurde zur Auswertung die $\Delta\Delta C_t$ -Methode angewandt. Der Expressionsunterschied des Markers VEGF A, jeweils dargestellt als die n-fache Expression der behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($= 1$), zeigte keine Signifikanz.

3.5 Mineralisierung

An Tag 14 von jedem Durchgang wurden die Zellen fixiert, die mineralisierte Matrix mit Alizarin Red S angefärbt und mithilfe von CPC (Cetylpyridiniumchlorid) die extrahierte Menge an Alizarin photometrisch bestimmt. Die mithilfe der Standardkurve durchschnittlich ermittelten Konzentrationen pro Gruppe unterschieden sich wenig voneinander (Kontrollgruppe: $298,988 \pm 138,376 \mu\text{M}$, Gruppe A: $346,642 \pm 151,057 \mu\text{M}$, Gruppe B: $341,951 \pm 243,15 \mu\text{M}$). Bei Betrachtung der einzelnen Spender (Abb. 13) fällt auf, dass bei einem Spender in allen drei Gruppen eine deutlich höhere Alizarin-Konzentration als bei den anderen ermittelt wurde. Bei der Gesamtauswertung (Abb. 12) wurde dieser Spender III nicht mit einbezogen. Der Vollständigkeit halber ist in Abbildung 14 die Auswertung aller vier Spender dargestellt. Die PEMF-Therapie hat keinen deutlichen Effekt auf die Mineralisierung.

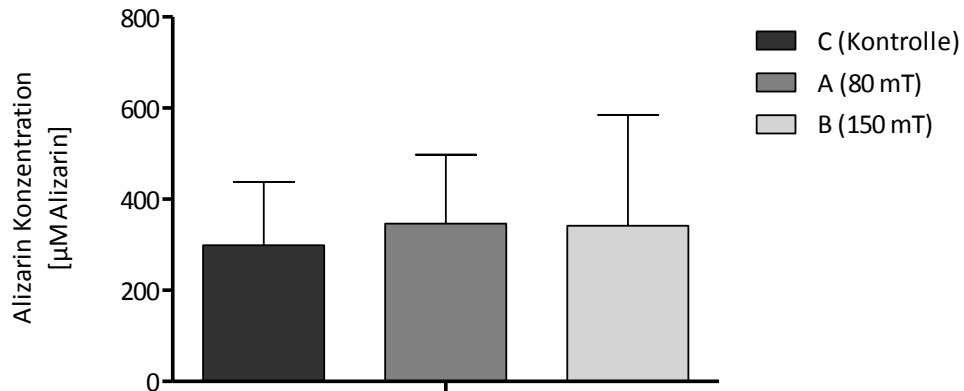


Abbildung 12 Quantifizierung der Mineralisierung mittels Alizarin Red-Färbung nach vierwöchiger osteogener Induktion mit ODM (Gruppe C) sowie inklusive zweiwöchiger PEMF-Exposition mit 80 mT (Gruppe A) und 150 mT (Gruppe B). n=3

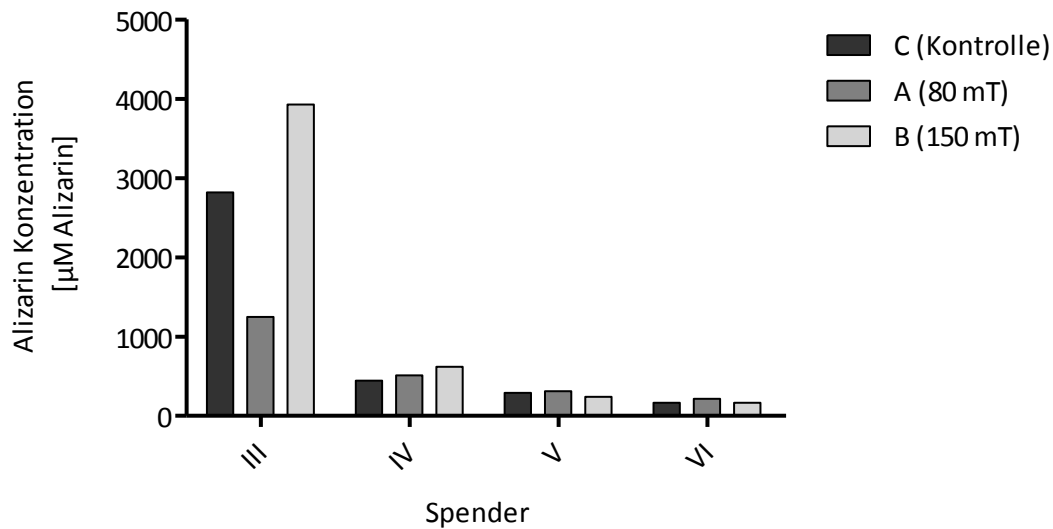


Abbildung 13 Quantifizierung der Mineralisierung mittels Alizarin Red-Färbung. Darstellung der einzelnen Spender an Tag 14.

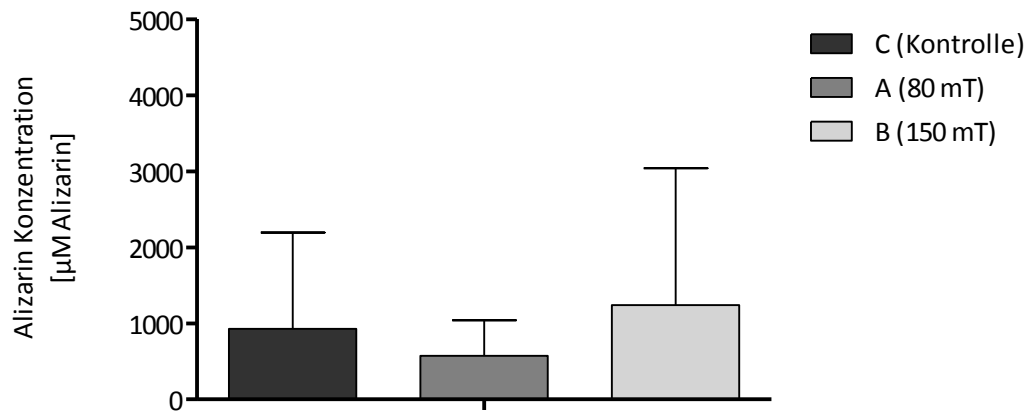


Abbildung 14 Quantifizierung der Mineralisierung mittels Alizarin Red-Färbung nach vierwöchiger osteogener Induktion mit ODM (Gruppe C) sowie inklusive zweiwöchiger PEMF-Exposition mit 80 mT (Gruppe A) und 150 mT (Gruppe B). n=4

4 Diskussion

4.1 Isolierung und Einsatz der mesenchymalen Stammzellen

Für diese Arbeit wurden die MSCs aus dem Knochenmark menschlicher Hüftköpfe isoliert, anschließend kultiviert und passagiert. In der Literatur findet man aufgrund der interindividuellen Heterogenität keinen spezifischen, universellen Oberflächenmarker zum Nachweis, dass es sich bei der Zellkultur um MSCs handelt. In Abhängigkeit vom eingesetzten Kulturmedium (Hagmann et al., 2013) und der Kulturdauer (Busser et al., 2015) sind die Zellen für unterschiedliche Oberflächenmarker positiv. Das Vorgehen der Isolierung nach Standardprotokoll sowie die Charakterisierungsmerkmale der MSCs, in vitro plastikadhärent zu sein und mittels osteogenem Medium in Osteoblasten zu differenzieren, bestätigte in der vorliegenden Arbeit die erfolgreiche Isolierung und Kultivierung (Kolbe et al., 2011). In vitro wurden nicht die Verhältnisse, die vor Ort bei einer schlecht heilenden Fraktur herrschen, nachgestellt, sondern lediglich die Auswirkungen der elektromagnetischen Impulse auf MSCs beobachtet. Dieser Aspekt sollte generell in Studien stärker berücksichtigt werden, allerdings sind Pseudarthrose-Modelle schwer zu etablieren (Kooistra et al., 2009). Tiermodelle frischer Frakturen inklusive der Analyse der Knochenneubildung und –heilung wären ein weiterer Ansatzpunkt (Ho et al., 2015).

Kritisch zu betrachten ist ebenfalls die Heterogenität der MSCs bzw. der Spender, welche die Vergleichbarkeit der Ergebnisse und Messungen einschränkt. Dies gilt sowohl für in vitro- als auch in vivo-Untersuchungen. In vivo wird dies durch das Zusammenspiel verschiedener Zellen, Abläufe und Faktoren erschwert. Der Heilungsprozess ist vom Alter, Geschlecht und gesundheitlichen Zustand des Patienten, der Art des Knochendefektes und der Dauer der vorherigen Disabilität abhängig. Allerdings sollte gerade der Einsatz etablierter Protokolle zur Kultivierung und Auswertung in vitro, wie auch im Rahmen dieser Arbeit, solche Heterogenitäten herausfiltern, sodass der Einfluss der elektromagnetischen Felder auf lediglich eine Zellgruppe bzw. einzelne Vorgänge analysiert und verglichen werden kann.

4.2 Beurteilung der Zytotoxizität

Der an Tag 1, 7 sowie 14 nach Aussaat der Zellen auf den Mikrotiterplatten vom 24 Well-Format durchgeführte MTS-Assay diente der Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen. In vitro-Untersuchungen von Lin und Lin zeigten, dass Osteoblasten unter PEMF-Exposition eine verstärkte Zellproliferation (23 %) sowie Viabilität (36 %) im Vergleich zur Kontrolle aufweisen (Lin and Lin, 2011). Auch Barnaba et al. schlussfolgerten, dass die

Anwendung von PEMF die zelluläre Proliferation gegenüber der Kontrollgruppe beschleunigt (Barnaba et al., 2013; Chang et al., 2004). Jansen et al. allerdings gelangten zu der Aussage, dass der Einsatz von PEMF die Differenzierung von MSCs auf Kosten der Proliferation induziert (Jansen et al., 2010).

In dieser Arbeit zeigte sich im zeitlichen Verlauf zwar eine Zunahme der metabolischen Aktivität der Zellen, allerdings war diese an Tag 7 bei den beiden behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert. An Tag 14 zeigte sich kein signifikanter Unterschied. In zukünftigen Untersuchungen wäre es sinnvoll, andere Assays anzuwenden. Der in dieser Arbeit eingesetzte PicoGreen zum Beispiel ist ein DNA-Assay hoher Präzision, der wenig Auto-Fluoreszenz aufweist. Über die Bestimmung der DNA-Menge kann auf die Zellproliferation geschlossen werden. Pro Gruppe wurden drei Wells zur DNA-Quantifizierung ausgewertet. Bei den Messungen der Fluoreszenz zeigten sich innerhalb derer aber teilweise große Schwankungen bis um das Dreifache. PicoGreen ist nicht dazu fähig, Zellmembranen zu penetrieren (Quent et al., 2010). Hier könnte der entscheidende Punkt der Inhomogenität der Ergebnisse dieser Arbeit begründet sein. Eine weitere Fehlerquelle könnte im Vorgang des Erntens der Zellen zu finden sein. Der ausgeprägte Zelllayer, vor allem an Tag 14, erschwerte das Lösen der Zellen sowie die Resuspension ohne den Verlust eines Großteils der Zellen. Nach Modifizierung des gesamten Vorgehens gelang es erst für die letzten beiden Spender, nachvollziehbare Ergebnisse zu generieren. Aus dem Grund ist es schwierig, die anderen Analysen und Ergebnisse auf den DNA-Gehalt zu beziehen. Von einer Darstellung der Ergebnisse wurde abgesehen. Verfahren zur Zellzahlbestimmung einer Zelllinie während des gesamten Durchganges, ohne dass die Zellen abgelöst und verworfen werden, sind erstrebenswert.

Ceccarelli et al. schlussfolgerten, dass die PEMF-Therapie nicht nur die Proliferation und Differenzierung von Knochenzellen in vitro über die Verstärkung der DNA-Synthese beeinflusst, sondern ebenfalls die Produktion kalzifizierter Matrix sowie die Genexpression von Knochenmarkern während der Differenzierung steigert (Ceccarelli et al., 2013).

4.3 Möglichkeiten zur Analyse der osteogenen Differenzierung

An Tag 7 sowie an Tag 14 wurde in dieser Arbeit die relative Expression der osteogenen Marker Kollagen I (Col I), Alkalische Phosphatase (ALPL), Osteocalcin (BGLAP) sowie BMP-2 der beiden behandelten Gruppen gegenüber der Kontrollgruppe mittels Realtime-PCR bestimmt.

Es zeigte sich, dass unter den gegebenen Bedingungen die PEMF-Therapie die Col I-Expression nicht verstärken konnte.

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase ist ein frühes Merkmal der Osteogenese und wird in einer Vielzahl von Studien als Marker verwendet (Luo et al., 2012; Yan et al., 2010; Yu et al., 2014). Es gibt verschiedene Methoden zur Detektion der ALP-Aktivität. Meist erfolgt ihr Nachweis indirekt über die Messung der Enzymaktivität bei der Umsetzung von p-Nitrophenol als Substrat. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Expression des Gens ALPL untersucht. In der späteren Phase der osteoblastären Differenzierung, wenn Gene wie Osteocalcin hochreguliert werden, nimmt die ALP-Expression ab (Declercq et al., 2005). Dieser zeitliche Zusammenhang konnte nicht beobachtet werden.

Der reife Osteoblast wird von einer hohen Expression von Osteocalcin charakterisiert (Lind et al., 2013). Möglicherweise wurde in dieser Arbeit nicht der Zeitpunkt der Differenzierung analytisch erfasst, in dem sich die Höhe der Expression umkehrt. Jansen et al. schlussfolgerten, dass die PEMF-Exposition zu einer frühen Hochregulierung verschiedener osteoblastärer Gene führt; diese Beobachtungen machten sie allerdings schon am 9. Tag kontinuierlicher Exposition und früher (Jansen et al., 2010).

Die BMPs, Mitglieder der TGF- β -Superfamilie (Transforming Growth Factor, Transformierender Wachstumsfaktor), wirken auch in vitro stimulierend (Acil, 2014). Schwartz et al. formulierten, dass PEMF in vivo das Ansprechen von MSCs auf BMP-2 verbessert. Es konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass BMPs in unterschiedlichen Konzentrationen die Proliferation, Mineralisierung und mRNA-Expression Knochengewebe-assoziiierter Gene unterschiedlich regulieren (Hakki et al., 2014). Diese Beobachtungen beziehen sich auf die Induktionsmöglichkeiten durch BMPs bei externer Zugabe. Sie gaben in dieser Arbeit Anstoß zur Analyse der Genexpression des BMP-2 unter PEMF-Exposition; allerdings war keine Hochregulierung gegenüber der nichtexponierten Kontrollgruppe zu verzeichnen. Esposito et al. beschrieben nach einer 14-tägigen Behandlung von MSCs, acht Stunden täglich, dass die PEMF-behandelte Gruppe früher mit der Differenzierung beginnt als die unbehandelte (Esposito et al., 2012). Vergleicht man die Ergebnisse der in vitro-Studien mit denen der vorliegenden Arbeit, so lässt sich keine sichere Aussage bezüglich des Einflusses der elektromagnetischen Impulse treffen. Es war kein Unterschied zwischen dem Einsatz von 80 mT gegenüber 150 mT zu verzeichnen sowie kein statistisch signifikanter Unterschied gegenüber der nichtexponierten Kontrollgruppe. Um validere Aussagen treffen zu können, müsste man die Genexpression zu häufigeren Zeitpunkten untersuchen. Dass der Prozess der Differenzierung durch viele andere Faktoren wie die Zelldichte und ihre Anordnung, das Alter des Spenders, die Passage der Kultur oder äußerliche Einflüsse gesteuert ist, erschwert die Vergleichbarkeit sowohl der einzelnen

Spender als auch der unterschiedlichen Studien (Zachar et al., 2016). Andererseits ist zu berücksichtigen, dass eine erhöhte oder erniedrigte Expression von osteogenen Markern je nach Einfluss eindeutig detektierbar ist. In der vorliegenden Arbeit ist kein signifikanter Unterschied zwischen den PEMF-exponierten und den nicht-exponierten Zellen zu beobachten; den Nachweis einer erfolgreichen Differenzierung erbringen alle Zellen.

Für zukünftige Studien besteht die Möglichkeit, die Differenzierung zu Osteoblasten erst mit Versuchsbeginn zu starten und somit von Anfang an unter dem Einfluss der unterschiedlichen magnetischen Flussdichte der PEMF zu beobachten. Angaben wie Tag 1 oder Tag 14 beziehen sich stets auf die Anzahl der Tage nach Aussaat der Zellen in den 24 Well-Mikrotiterplatten. In dieser Arbeit erschwerte die bereits zwei Wochen vor der ersten PEMF-Therapie gestartete Kultivierung im osteogenen Differenzierungsmedium, die Beobachtungen den einzelnen Phasen der osteogenen Differenzierung zuzuordnen und die Ergebnisse auf die Exposition gegenüber den pulsierenden elektromagnetischen Feldern zurückzuführen. Möglicherweise waren die Zellen zum fortgeschrittenen Messzeitpunkt bereits ausdifferenziert.

4.4 Beurteilung der Mineralisierung

Einige Studien haben von einer gesteigerten Ablagerung von Ca^{2+} -reicher extrazellulärer Matrix unter dem Einfluss von PEMFs berichtet (Jansen et al., 2010; Viganò et al., 2016).

Eine mindestens dreiwöchige Behandlung des konfluenten Zellrasens mit Dexamethason, in Kombination mit β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure, ist notwendig, um letztendlich eine in vitro-Mineralisierung herbeizuführen (Song et al., 2009). Ab etwa zwei Wochen vor Beginn der durchgeführten Versuche wurde das ODM als Medium eingesetzt. Angesichts der sich daraus ergebenden vierwöchigen Anzucht in ODM an „Tag 14“, wurde zu diesem Zeitpunkt die Analyse zum Ausmaß der osteogenen Differenzierung unter dem Einfluss des ODM sowie zusätzlich der pulsierenden elektromagnetischen Felder als aussagekräftig erachtet. In der Auswertung fiel auf, dass in allen drei Gruppen aller Spender, bis auf eine Ausnahme, lediglich eine geringe Menge an Alizarin zu messen war. Jähn et al. merkten an, dass Monolayer-Kulturen von menschlichen primären Osteoblasten häufig unzufriedenstellende Ergebnisse bezüglich der Ablagerung, Reifung und Kalzifizierung der Extrazellulären Matrix zeigen. Dennoch sind Monolayer-Kulturen nach wie vor Methode der Wahl für die in vitro-Differenzierung von Osteoblasten (Jähn et al., 2010).

Abgesehen davon, zeigte sich zwischen den beiden PEMF-exponierten Gruppen und der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied bezüglich des Ausmaßes der Mineralisierung.

Das passt zu dem Ergebnis der Studie von Petecchia, dass diese späte Phase der osteogenen Differenzierung nicht von PEMFs beeinflusst wird (Petecchia et al., 2015). Die Hypothese, dass die PEMF-Therapie in der Differenzierungsphase effektiver ist, während sie in der Mineralisierungsphase eine inhibitorische Wirkung zeigt (Diniz et al., 2002), lässt sich unter diesen Bedingungen nicht unterstützen.

4.5 Analyse zur Freisetzung von VEGF

In der vorliegenden Arbeit wurde die VEGF-Konzentration im Überstand der Zellen mittels ELISA bestimmt. Es sollte untersucht werden, inwiefern die Freisetzung von VEGF durch elektromagnetische Impulse beeinflusst wird. Generell findet man in der Literatur nur wenige Studien zu diesem Aspekt des Einflusses der PEMF.

Die Ergebnisse des VEGF-ELISA legen die Vermutung nahe, dass eine magnetische Flussdichte von 80 mT einen fördernden Effekt auf die Freisetzung von VEGF besitzt; die Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe erreichte statistische Signifikanz. Diesen Aspekt könnte man an weiteren Spenderzellen untersuchen und zusätzlich dazu analysieren, welchen Einfluss eine tägliche Exposition oder ein Behandlungszeitraum von mehreren Wochen besitzt, und ob sich die Ergebnisse auch bei einer selteneren Exposition zeigen.

Es muss berücksichtigt werden, dass Osteoblasten das VEGF als Reaktion auf eine Reihe von Stimuli produzieren; dazu gehört u.a. eine saure und hypoxische Umgebung als Folge der Unterbrechung der Blutversorgung nach einer knöchernen Verletzung. Die dann vor Ort mutmaßlich herrschenden Verhältnisse, die zum Beispiel Spector et al. in vitro nachstellten (Spector et al., 2001), sind schwer zu übertragen und wurden im Versuchsaufbau dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Die komplexen Zell-Zell- und Zell-EZM-Interaktionen könnten mittels in vitro-Angiogenese-Modellen, sowohl zweidimensional als auch dreidimensional, genauer untersucht werden (Ucuzian and Greisler, 2007).

Ko-Kultur-Modelle mit Endothelzellen, um die gegenseitige Beeinflussung von MSCs und Endothelzellen zu analysieren, stellen einen Ansatz für weitere Studien dar.

4.6 Versuchsaufbau, Parameter und Anwendung der PEMF-Therapie

Bei allen Einstellungen gilt es, die Befürchtung fehlender biologischer Sicherheit zu berücksichtigen. Es wird nach wie vor diskutiert, wie hoch die optimale Flussdichte gewählt

werden soll und wie sie sich auf die einzelnen Gewebe auswirkt (Funk et al., 2009). Einige Berichte deuten an, dass eine höhere Intensität und Frequenz der EMF einen nachteiligen Effekt auf den menschlichen Körper haben kann. Li et al. formulierten, dass eine Langzeitexposition gegenüber PEMF zu einem oxidativen Schaden der Leber und der Milz führen kann, nachdem sie Ratten zehn Wochen lang pulsierenden elektromagnetischen Feldern von 50 Hz und maximal 20 mT ausgesetzt hatten (Li et al., 2015). Laut anderer Autoren hat die Exposition gegenüber einem magnetischen Feld keinen schädigenden Einfluss auf das Zellwachstum oder eine genetische Toxizität, unabhängig von der magnetischen Dichte (Silva et al., 2006).

Aus der Behandlung von Patienten mit PEMF-Parametern, welche in keiner Studie bezüglich der biologischen Sicherheit und therapeutischen Wirksamkeit unterstützt werden, können klinische Komplikationen, schlechtere pathologische Bedingungen und eine Inhibition der osteogenetischen Aktivität resultieren (Massari et al., 2009).

Obwohl die FDA eine Stimulationsdauer von mindestens zehn Stunden pro Tag empfiehlt, haben Fu et al. im Jahr 2014 in einer Studie mit einem modifizierten Protokoll der sog. Einzelpuls-Elektromagnetischen Felder zeigen können, dass sich bei dreiminütiger Behandlung täglich bei 1 Tesla nach drei bis sieben Tagen eine signifikant verstärkte osteogene Differenzierung gegenüber der Kontrollgruppe zeigte (Fu et al., 2014).

In dieser Arbeit wurden Intensitäten von 80 und 150 mT eingesetzt. Mit 3 Hz wurde in dieser Arbeit die maximal einzustellende Frequenz des genutzten Gerätes gewählt. Damit bewegt man sich im unteren Bereich der extrem niedrigen Frequenzen. Diese Frequenz von lediglich 3 Hz muss kritisch betrachtet werden, da Studien aufgezeigt haben, dass PEMFs im Bereich von 15-30 Hz den stärksten osteogenetischen Effekt haben (Lu et al., 2015). Kang et al. wählten nach eigenen Angaben positive (30/45 Hz, 1 mT) und negative (7,5 Hz, 1 mT) Bedingungen zur osteogenen Differenzierung. Ihr Ergebnis einer geminderten ALP-Aktivität sowie eines geringeren Kalziumgehalts der mit 7,5 Hz behandelten MSCs gegenüber der Kontrollgruppe ließ die Autoren schlussfolgern, dass solch eine niedrige Frequenz die osteogene Differenzierung sogar hemmt (Kang et al., 2013). Luo et al. sind nach der in vitro-Untersuchung des Effektes verschiedener Frequenzen elektromagnetischer Impulse auf MSCs zu der Schlussfolgerung gelangt, dass eine Frequenz von 50 Hz die wirkungsvollste zur Einleitung der osteoblastären Differenzierung ist (Luo et al., 2012). Hier wird einmal mehr der Bedarf einer einheitlichen Parameterwahl mit bewiesener Wirksamkeit deutlich.

Der Versuchsaufbau bietet Optionen für weitere Untersuchungen. So könnte man diese Intensitäten variieren, die Zellen täglich mit den PEMFs behandeln oder auch die Expositionsdauer verlängern. Die diversen Möglichkeiten verdeutlichen, warum die Einstellungen in den verschiedenen Studien derart variieren. Etablierte Protokolle zur

Analyse des in vitro-Zellverhaltens sind grundlegend. Außerdem stellt sich die Frage, inwiefern die in vitro gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen und die Effekte im Rahmen der Knochenheilung übertragbar sind.

Bei der Wirksamkeit dieser Methode muss stets berücksichtigt werden, dass diese mit der Vielschichtigkeit der Frakturtypen und Bedingungen des Patienten variiert und ein erfolgreiches Ergebnis schwer vorhergesagt werden kann (Chalidis et al., 2011). Ein chirurgisches Vorgehen wird gewöhnlich bevorzugt; vor allem bei Frakturen, die mit Infektionen, Deformitäten, Verkürzungen und Knochendefekten verbunden sind.

Nichtsdestotrotz wird die PEMF-Therapie weitflächig zur Behandlung von u.a. Pseudarthrosen, Rückenschmerzen, Wundheilungsstörungen und Arthrose eingesetzt und zeigt in klinischen Studien positive Auswirkungen. Hannemann et al. konnten in einer Metaanalyse randomisierter Versuche zeigen, dass die PEMF-Therapie beim konservativen Vorgehen die Zeit bis zur radiologischen Vereinigung akuter Frakturen signifikant verkürzt (Hannemann et al., 2014).

5 Zusammenfassung

Die Anwendung pulsierender elektromagnetischer Felder in der Behandlung von Knochenbrüchen wird seit mehreren Jahrzehnten erforscht. Diese adjuvante Therapieform zur Förderung der Knochenheilung, Behandlung von Pseudarthrosen und Schmerzreduktion wird bereits im klinischen Alltag eingesetzt. Ein einheitliches Behandlungsschema bezüglich der Intensität, Frequenz sowie der Applikationsdauer eines solchen Magnetfeldes existiert bisher noch nicht. Die Mechanismen auf zellulärer Ebene sind nur wenig verstanden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, *in vitro* die Effekte einer hochenergetischen Impulstherapie auf für die Knochenregeneration wichtige Prozesse bei niedriger Frequenz zu analysieren. Für die Untersuchungen wurden nach Einverständnis des Patienten mesenchymale Stammzellen nach Standardprotokoll aus dem Knochengewebe von Überschussmaterial von fünf Spendern isoliert, kultiviert und mittels osteogenem Differenzierungsmedium in Osteoblasten differenziert. Innerhalb eines 14-tägigen Durchganges wurden die Zellen sechsmal pulsierenden elektromagnetischen Feldern mit einer Intensität von 80 mT bzw. 150 mT bei 3 Hz für 10 Minuten ausgesetzt, die nichtexponierten Zellen bildeten die Kontrollgruppe. Analysen zur Viabilität, osteogenen Differenzierung auf Genexpressionsebene, Mineralisierung und zum Einfluss auf den Wachstumsfaktor VEGF wurden an Tag 7 und/oder Tag 14 durchgeführt.

An Tag 7 wurde im Überstand der mit 80 mT behandelten Zellen mittels ELISA eine signifikant höhere VEGF-Konzentration als in der Kontrollgruppe gemessen. Dieses Ergebnis bietet eine Grundlage für die weitere Erforschung der Beeinflussung der für den Prozess der Osteogenese unerlässlichen Angiogenese mittels pulsierender elektromagnetischer Felder. Bei den restlichen Analysen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten Gruppen und der unbehandelten Kontrollgruppe.

Die Spender-, Isolierung- und Kultur-bedingten Gegebenheiten und Heterogenitäten *in vitro* erschweren es, gerade bei einer kleinen Spenderanzahl, generelle Aussagen bezüglich der Effekte der pulsierenden elektromagnetischen Felder und der adäquaten Auswahl der Parameter Intensität, Frequenz und Applikationsdauer zu treffen. Dennoch, oder möglicherweise gerade deshalb, bietet diese Therapieform ausreichend Grundlagen zur weiteren Forschung bezüglich der Wirkweise auf zellulärer Ebene und der Auswirkungen im zeitlichen Verlauf.

6 Literaturverzeichnis

- Abdallah, B.M., Kassem, M., 2008. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 15, 109–116.
- Aubin, J.E., 1998. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* 76, 899–910.
- Barnaba, S., Papalia, R., Ruzzini, L., Sgambato, A., Maffulli, N., Denaro, V., 2013. Effect of pulsed electromagnetic fields on human osteoblast cultures. *Physiother. Res. Int. J. Res. Clin. Phys. Ther.* 18, 109–114.
- Bassett, C.A., Mitchell, S.N., Gaston, S.R., 1982. Pulsing electromagnetic field treatment in ununited fractures and failed arthrodeses. *JAMA* 247, 623–628.
- Beamer, B., Hettrich, C., Lane, J., 2010. Vascular endothelial growth factor: an essential component of angiogenesis and fracture healing. *HSS J. Musculoskelet. J. Hosp. Spec. Surg.* 6, 85–94.
- Bianco, P., Cao, X., Frenette, P.S., Mao, J.J., Robey, P.G., Simmons, P.J., Wang, C.-Y., 2013. The meaning, the sense and the significance: Translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat. Med.* 19, 35–42.
- Bieback, K., Wuchter, P., Besser, D., Franke, W., Becker, M., Ott, M., Pacher, M., Ma, N., Stamm, C., Klüter, H., Müller, A., Ho, A.D., START-MSc consortium, 2012. Mesenchymal stromal cells (MSCs): science and f(r)iction. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 90, 773–782.
- Bodamyali, T., Bhatt, B., Hughes, F.J., Winrow, V.R., Kanczler, J.M., Simon, B., Abbott, J., Blake, D.R., Stevens, C.R., 1998. Pulsed electromagnetic fields simultaneously induce osteogenesis and upregulate transcription of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in rat osteoblasts in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 458–461.
- Bonhomme-Faivre, L., Marion, S., Bezie, Y., Auclair, H., Fredj, G., Hommeau, C., 1998. Study of human neurovegetative and hematologic effects of environmental low-frequency (50-Hz) electromagnetic fields produced by transformers. *Arch. Environ. Health* 53, 87–92.
- Bragin, D.E., Statom, G.L., Hagberg, S., Nemoto, E.M., 2015. Increases in microvascular perfusion and tissue oxygenation via pulsed electromagnetic fields in the healthy rat brain. *J. Neurosurg.* 122, 1239–1247.
- Busser, H., Najar, M., Raicevic, G., Pieters, K., Velez Pombo, R., Philippart, P., Meuleman, N., Bron, D., Lagneaux, L., 2015. Isolation and Characterization of Human Mesenchymal Stromal Cell Subpopulations: Comparison of Bone Marrow and Adipose Tissue. *Stem Cells Dev.* 24, 2142–2157.
- Ceccarelli, G., Bloise, N., Mantelli, M., Gastaldi, G., Fassina, L., De Angelis, M.G.C., Ferrari, D., Imbriani, M., Visai, L., 2013. A comparative analysis of the in vitro effects of pulsed electromagnetic field treatment on osteogenic differentiation of two different mesenchymal cell lineages. *BioResearch Open Access* 2, 283–294.

- Chalidis, B., Sachinis, N., Assiotis, A., Maccauro, G., 2011. Stimulation of bone formation and fracture healing with pulsed electromagnetic fields: biologic responses and clinical implications. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 24, 17–20.
- Chang, W.H.-S., Chen, L.-T., Sun, J.-S., Lin, F.-H., 2004. Effect of pulse-burst electromagnetic field stimulation on osteoblast cell activities. *Bioelectromagnetics* 25, 457–465.
- Coelho, M.J., Fernandes, M.H., 2000. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 21, 1095–1102.
- Declercq, H.A., Verbeeck, R.M.H., De Ridder, L.I.F.J.M., Schacht, E.H., Cornelissen, M.J., 2005. Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures. *Biomaterials* 26, 4964–4974.
- Dickson, K., Katzman, S., Delgado, E., Contreras, D., 1994. Delayed unions and nonunions of open tibial fractures. Correlation with arteriography results. *Clin. Orthop.* 189–193.
- Diniz, P., Shomura, K., Soejima, K., Ito, G., 2002. Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. *Bioelectromagnetics* 23, 398–405.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.
- Dupont, G., Combettes, L., Bird, G.S., Putney, J.W., 2011. Calcium Oscillations. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.
- Esposito, M., Lucariello, A., Riccio, I., Riccio, V., Esposito, V., Riccardi, G., 2012. Differentiation of human osteoprogenitor cells increases after treatment with pulsed electromagnetic fields. *Vivo Athens Greece* 26, 299–304.
- Funk, R.H.W., Monsees, T., Ozkucur, N., 2009. Electromagnetic effects - From cell biology to medicine. *Prog. Histochem. Cytochem.* 43, 177–264.
- Granéli, C., Thorfve, A., Ruetschi, U., Brisby, H., Thomsen, P., Lindahl, A., Karlsson, C., 2014. Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach. *Stem Cell Res.* 12, 153–165.
- Hagmann, S., Moradi, B., Frank, S., Dreher, T., Kämmerer, P.W., Richter, W., Gotterbarm, T., 2013. Different culture media affect growth characteristics, surface marker distribution and chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Musculoskelet. Disord.* 14, 223.
- Hakki, S.S., Bozkurt, B., Hakki, E.E., Kayis, S.A., Turac, G., Yilmaz, I., Karaoz, E., 2014. Bone morphogenetic protein-2, -6, and -7 differently regulate osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 102, 119–130.
- Hannemann, P.F.W., Mommers, E.H.H., Schots, J.P.M., Brink, P.R.G., Poeze, M., 2014. The

effects of low-intensity pulsed ultrasound and pulsed electromagnetic fields bone growth stimulation in acute fractures: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 134, 1093–1106.

Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., Jacobs, R., 2011. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun. Signal. CCS* 9, 12.

Hei, W.-H., Byun, S.-H., Kim, J.-S., Kim, S., Seo, Y.-K., Park, J.-C., Kim, S.-M., Jahng, J.W., Lee, J.-H., 2016. Effects of electromagnetic field (PEMF) exposure at different frequency and duration on the peripheral nerve regeneration: in vitro and in vivo study. *Int. J. Neurosci.* 126, 739–748.

Ho, C.-Y., Sanghani, A., Hua, J., Coathup, M., Kalia, P., Blunn, G., 2015. Mesenchymal Stem Cells with Increased Stromal Cell-Derived Factor 1 Expression Enhanced Fracture Healing. *Tissue Eng. Part A* 21, 594–602.

Jähn, K., Richards, R.G., Archer, C.W., Stoddart, M.J., 2010. Pellet culture model for human primary osteoblasts. *Eur. Cell. Mater.* 20, 149–161.

Jansen, J.H.W., van der Jagt, O.P., Punt, B.J., Verhaar, J.A.N., van Leeuwen, J.P.T.M., Weinans, H., Jahr, H., 2010. Stimulation of osteogenic differentiation in human osteoprogenitor cells by pulsed electromagnetic fields: an in vitro study. *BMC Musculoskelet. Disord.* 11, 188.

Kaivosoja, E., Sariola, V., Chen, Y., Kontinen, Y.T., 2015. The effect of pulsed electromagnetic fields and dehydroepiandrosterone on viability and osteo-induction of human mesenchymal stem cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 9, 31–40.

Keating, A., 2012. Mesenchymal Stromal Cells: New Directions. *Cell Stem Cell* 10, 709–716.

Klontzas, M.E., Kenanidis, E.I., MacFarlane, R.J., Michail, T., Potoupnis, M.E., Heliotis, M., Mantalaris, A., Tsiridis, E., 2016. Investigational drugs for fracture healing: preclinical & clinical data. *Expert Opin. Investig. Drugs* 25, 585–596.

Kolbe, M., Xiang, Z., Dohle, E., Tonak, M., Kirkpatrick, C.J., Fuchs, S., 2011. Paracrine Effects Influenced by Cell Culture Medium and Consequences on Microvessel-Like Structures in Cocultures of Mesenchymal Stem Cells and Outgrowth Endothelial Cells. *Tissue Eng. Part A* 17, 2199–2212.

Kooistra, B.W., Jain, A., Hanson, B.P., 2009. Electrical stimulation: Nonunions. *Indian J. Orthop.* 43, 149–155.

Kwan, R.L.-C., Wong, W.-C., Yip, S.-L., Chan, K.-L., Zheng, Y.-P., Cheing, G.L.-Y., 2015. Pulsed electromagnetic field therapy promotes healing and microcirculation of chronic diabetic foot ulcers: a pilot study. *Adv. Skin Wound Care* 28, 212–219.

Langenbach, F., Handschel, J., 2013. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res. Ther.* 4, 117.

Li, B., Li, W., Bi, J.-Q., Zhao, J., Qu, Z.-W., Lin, C., Yang, S.-L., Meng, Q., Yue, Q., 2015. Effect of long-term pulsed electromagnetic field exposure on hepatic and immunologic functions of rats. *Wien. Klin. Wochenschr.* 127, 959–962.

Lin, H.-Y., Lin, Y.-J., 2011. In vitro effects of low frequency electromagnetic fields on osteoblast proliferation and maturation in an inflammatory environment. *Bioelectromagnetics* 32, 552–560.

Lind, T., Sundqvist, A., Hu, L., Pejler, G., Andersson, G., Jacobson, A., Melhus, H., 2013. Vitamin A Is a Negative Regulator of Osteoblast Mineralization. *PLoS ONE* 8.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif* 25, 402–408.

Lüllmann-Rauch, R. (Ed.), 2012. *Histologie*, 4th ed. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Luo, F., Hou, T., Zhang, Z., Xie, Z., Wu, X., Xu, J., 2012. Effects of pulsed electromagnetic field frequencies on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Orthopedics* 35, e526-531.

Maes, Carmeliet, Schipani, 2012. Hypoxia-driven pathways in bone development, regeneration and disease. - PubMed - NCBI [WWW Document]. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22450551> (accessed 6.15.17).
Markov, M.S., 2007. Expanding use of pulsed electromagnetic field therapies. *Electromagn. Biol. Med.* 26, 257–274.

Marsell, R., Einhorn, T.A., 2011. The biology of fracture healing. *Injury* 42, 551–555.
Massari, L., Caruso, G., Sollazzo, V., Setti, S., 2009. Pulsed electromagnetic fields and low intensity pulsed ultrasound in bone tissue. *Clin. Cases Miner. Bone Metab. Off. J. Ital. Soc. Osteoporos. Miner. Metab. Skelet. Dis.* 6, 149–154.

Ogilvie, C.M., Lu, C., Marcucio, R., Lee, M., Thompson, Z., Hu, D., Helms, J.A., Miclau, T., 2012. Vascular Endothelial Growth Factor Improves Bone Repair in a Murine Nonunion Model. *Iowa Orthop. J.* 32, 90–94.

Ongaro, A., Pellati, A., Bagheri, L., Fortini, C., Setti, S., De Mattei, M., 2014. Pulsed electromagnetic fields stimulate osteogenic differentiation in human bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Bioelectromagnetics* 35, 426–436.

Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A., Bigham-Sadegh, A., 2014. Bone morphogenetic proteins: a powerful osteoinductive compound with non-negligible side effects and limitations. *BioFactors Oxf. Engl.* 40, 459–481.

Owen, T.A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L.M., Wilming, L., Tassinari, M.S., Kennedy, M.B., Pockwinse, S., Lian, J.B., Stein, G.S., 1990. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J. Cell. Physiol.* 143, 420–430.

Percival, C.J., Richtsmeier, J.T., 2013. Angiogenesis and Intramembranous Osteogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 242, 909–922.

Petecchia, L., Sbrana, F., Utzeri, R., Vercellino, M., Usai, C., Visai, L., Vassalli, M., Gavazzo, P., 2015. Electro-magnetic field promotes osteogenic differentiation of BM-hMSCs through a selective action on Ca²⁺-related mechanisms. *Sci. Rep.* 5.

- Quent, V.M., Loessner, D., Friis, T., Reichert, J.C., Hutmacher, D.W., 2010. Discrepancies between metabolic activity and DNA content as tool to assess cell proliferation in cancer research. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 1003–1013.
- Rankin, E., Giaccia, A., 2008. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. *Cell Death Differ.* 15, 678–685.
- Ross, C.L., Siriwardane, M., Almeida-Porada, G., Porada, C.D., Brink, P., Christ, G.J., Harrison, B.S., 2015. The effect of low-frequency electromagnetic field on human bone marrow stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cell Res.* 15, 96–108.
- Schipani, Maes, 2009. Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIF and VEGF.... [WWW Document]. ResearchGate. URL https://www.researchgate.net/figure/26322570_fig1_Regulation-of-osteogenesis-angiogenesis-coupling-by-HIF-and-VEGF-Mature-osteoblasts (accessed 6.15.17).
- Schwartz, Z., Fisher, M., Lohmann, C.H., Simon, B.J., Boyan, B.D., 2009. Osteoprotegerin (OPG) production by cells in the osteoblast lineage is regulated by pulsed electromagnetic fields in cultures grown on calcium phosphate substrates. *Ann. Biomed. Eng.* 37, 437–444.
- Silva, A.K.A., Silva, E.L., Egito, E.S.T., Carriço, A.S., 2006. Safety concerns related to magnetic field exposure. *Radiat. Environ. Biophys.* 45, 245–252.
- Sivaraj, K.K., Adams, R.H., 2016. Blood vessel formation and function in bone. *Dev. Camb. Engl.* 143, 2706–2715.
- Song, I.-H., Caplan, A.I., Dennis, J.E., 2009. In vitro dexamethasone pretreatment enhances bone formation of human mesenchymal stem cells in vivo. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* 27, 916–921.
- Spector, J.A., Mehrara, B.J., Greenwald, J.A., Saadeh, P.B., Steinbrech, D.S., Bouletreau, P.J., Smith, L.P., Longaker, M.T., 2001. Osteoblast expression of vascular endothelial growth factor is modulated by the extracellular microenvironment. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280, C72–80.
- Stegen, S., van Gastel, N., Carmeliet, G., 2015. Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone* 70, 19–27.
- Street, J., Bao, M., deGuzman, L., Bunting, S., Peale, F.V., Ferrara, N., Steinmetz, H., Hoeffel, J., Cleland, J.L., Daugherty, A., van Bruggen, N., Redmond, H.P., Carano, R.A.D., Filvaroff, E.H., 2002. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9656–9661.
- Sun, L.-Y., Hsieh, D.-K., Lin, P.-C., Chiu, H.-T., Chiou, T.-W., 2010. Pulsed electromagnetic fields accelerate proliferation and osteogenic gene expression in human bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation. *Bioelectromagnetics* 31, 209–219.
- Sun, L.-Y., Hsieh, D.-K., Yu, T.-C., Chiu, H.-T., Lu, S.-F., Luo, G.-H., Kuo, T.K., Lee, O.K., Chiou, T.-W., 2009. Effect of pulsed electromagnetic field on the proliferation and differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Bioelectromagnetics* 30, 251–260.
- Szczyński, G., 2015. Fracture Healing and its Disturbances. A Literature Review. *Ortop. Traumatol. Rehabil.* 17, 437–454.

- Tonelli, F.M.P., Santos, A.K., Gomes, D.A., da Silva, S.L., Gomes, K.N., Ladeira, L.O., Resende, R.R., 2012. Stem cells and calcium signaling. *Adv. Exp. Med. Biol.* 740, 891–916.
- Tsai, M.-T., Li, W.-J., Tuan, R.S., Chang, W.H., 2009. Modulation of osteogenesis in human mesenchymal stem cells by specific pulsed electromagnetic field stimulation. *J. Orthop. Res.* 27, 1169–1174.
- Tsao, Y.-T., Huang, Y.-J., Wu, H.-H., Liu, Y.-A., Liu, Y.-S., Lee, O.K., 2017. Osteocalcin Mediates Biomineralization during Osteogenic Maturation in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 18.
- Ucuzian, A.A., Greisler, H.P., 2007. In vitro models of angiogenesis. *World J. Surg.* 31, 654–663.
- van der Jagt, O.P., van der Linden, J.C., Waarsing, J.H., Verhaar, J.A.N., Weinans, H., 2012. Systemic treatment with pulsed electromagnetic fields do not affect bone microarchitecture in osteoporotic rats. *Int. Orthop.* 36, 1501–1506.
- Viganò, M., Sansone, V., d'Agostino, M.C., Romeo, P., Perucca Orfei, C., de Girolamo, L., 2016. Mesenchymal stem cells as therapeutic target of biophysical stimulation for the treatment of musculoskeletal disorders. *J. Orthop. Surg.* 11, 163.
- Wang, H., Pang, B., Li, Y., Zhu, D., Pang, T., Liu, Y., 2012. Dexamethasone has variable effects on mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 14, 423–430.
- Wang, T., Zhang, X., Bikle, D.D., 2017. Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing. *J. Cell. Physiol.* 232, 913–921.
- Wang, Y., Qin, Q.-H., 2012. A theoretical study of bone remodelling under PEMF at cellular level. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* 15, 885–897.
- Watt, S.M., Gullo, F., van der Garde, M., Markeson, D., Camicia, R., Khoo, C.P., Zwaginga, J.J., 2013. The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. *Br. Med. Bull.* 108, 25–53.
- Yan, J., Dong, L., Zhang, B., Qi, N., 2010. Effects of extremely low-frequency magnetic field on growth and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Electromagn. Biol. Med.* 29, 165–176.
- Ye, B., 2010. Ca²⁺ oscillations and its transporters in mesenchymal stem cells. *Physiol. Res.* 59, 323–329.
- Yu, J., Wu, H., Yang, Y., Liu, C., Liu, Y., Song, M., 2014. Osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells regulated by osteoblasts under EMF exposure in a co-culture system. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci. Hua Zhong Ke Ji Xue Xue Bao Yi Xue Ying Wen Ban Huazhong Keji Daxue Xuebao Yixue Yingdewen Ban* 34, 247–253.
- Zachar, L., Bačenkova, D., Rosocha, J., 2016. Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *J. Inflamm. Res.* 9, 231–240.
- Zhou, N., Li, Q., Lin, X., Hu, N., Liao, J.-Y., Lin, L.-B., Zhao, C., Hu, Z.-M., Liang, X., Xu, W., Chen, H., Huang, W., 2016. BMP2 induces chondrogenic differentiation, osteogenic differentiation and endochondral ossification in stem cells. *Cell Tissue Res.* 366, 101–111.

7 Anhang

7.1 Danksagung

An dieser Stelle gilt mein Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Sabine Fuchs, die stets ein offenes Ohr für mich hatte und mich während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation wissenschaftlich unterstützt hat.

Herrn Prof. Ludger Gerdesmeyer danke ich für die Vermittlung des Themas.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. André Krath, der mich mit seiner stets freundlichen und hilfsbereiten Art begleitet und motiviert hat. Dem Laborteam danke ich für die angenehme Zusammenarbeit, allen voran Fanlu Wang, deren Hilfestellungen sehr wertvoll waren.

Zum Schluss gilt mein ganz persönlicher Dank meiner Familie für die unermüdliche Stärkung und Motivierung.

7.2 Ethikvotum

MEDIZINISCHE FAKULTÄT DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Dr. med. André Krath
Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie
Universitätsklinikum Schleswig Holstein Campus Kiel
Arnold Heller Straße 3
24105 Kiel

Postadresse:
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9
D-24105 Kiel
Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-53 33
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum:

16. Februar 2016

AZ.: D 426/16 (bitte stets angeben)
Studienplan: **Komplexe Zellkultursysteme basierend auf Primär- und Stammzellen zur Grundlagenforschung im Bereich Differenzierung und Neovaskularisierung von Knochengewebe und dem Einfluss elektromagnetischer Felder**
Anschreiben vom 30.01.2016; Projektbeschreibung undatiert Version 1.0; Basisformular für einen Ethikantrag v. 10.02.2016; Information und Einwilligungserklärung Version 1.0 v. 30.01.2016; EG Zertifikat Theracell 100 v. 24.08.2012, Datenträger

Studienleiter und Antragsteller: Dr. André Krath, Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie
UKSH Kiel Campus Kiel
Antrag vom: 30. Januar 2016 (Eingang: 10. Februar 2016)

Sehr geehrter Herr Kollege Krath,

wir bestätigen den Eingang des obengenannten Antrages zur Beratung gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein. Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:

1. Die Einwilligungserklärung enthält im ersten Absatz einige orthografische Fehler, die korrigiert werden müssen.
2. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen der Studie der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.
3. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt beim Studienleiter.
4. Gemäß Deklaration von Helsinki **muss** der Ethik-Kommission nach Studienende ein Abschlussbericht vorgelegt werden, der eine Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Studie enthält.

Wir wünschen Ihnen für die Durchführung der Studie viel Erfolg.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn
Vorsitzender der Ethik-Kommission

Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

7.3 Veröffentlichungen

Krath, A., Klüter, T., Stukenberg, M., **Zielhardt, P.**, Gollwitzer, H., Harrasser, N., Hausdorf, J., Ringeisen, M., Gerdesmeyer, L., September 2017. Electromagnetic transduction therapy in non-specific low back pain: A prospective randomised controlled trial. Journal of Orthopaedics, Vol. 14, Issue 3, Pages 410-415